

Санкт-Петербургский Государственный Университет

Биологический факультет

Кафедра Эмбриологии

Семенова Дарья Сергеевна

Механизмы остеогенной дифференцировки интерстициальных клеток аортального
клапана человека

Выпускная квалификационная работа магистра

(Магистерская диссертация)

Работа выполнена в лаборатории

Молекулярной Кардиологии и Генетики

ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова»

(зав. лаб. – к.б.н., А. Б. Малашичева)

Научный руководитель:

Доц. каф. эмбриологии

к.б.н., А.Б. Малашичева

Санкт-Петербург

2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1. Формирование сердца в эмбриональном периоде	7
1.2. Развитие аортального клапана	9
1.3. Развитие двухстворчатого аортального клапана	11
1.4. Генетические механизмы формирования бicuspidального аортального клапана (БАК)	14
1.5. Аортальный стеноз	16
1.6. Механизмы оссификации и кальцификации тканей	17
1.7. Молекулярные механизмы кальцификации	18
1.8. Эндотелиально-мезенхимный переход	22
1.9. Сигнальный путь Notch и его компоненты	22
1.10. Участие сигнального пути Notch в развитии кальцификации аортального клапана	25
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	29
2.1. Материалы	29
2.1.1. Клеточные культуры	29
2.1.2. Штаммы бактерий	29
2.1.3. Плазмиды	29
2.1.4. Праймеры	30
2.2. Методы	32
2.2.1. Трансформация бактерий	32
2.2.2. Выделение плазмидной ДНК	33
2.2.3. Производство лентивирусных частиц	33
2.2.5. Магнитный сортиг CD31-позитивных клеток	35
2.2.6. Культивирование интерстициальных и эндотелиальных клеток аортального клапана человека	36
2.2.7. Сокультивирование интерстициальных клеток аортального клапана с эндотелиальными клетками	38
2.2.8. Трансдукция интерстициальных клеток аортального клапана лентивирусными частицами	38
2.2.9. Остеогенная дифференцировка интерстициальных клеток клапана аорты	38
2.2.10. Окраска дифференцированных в остеогенном направлении интерстициальных клеток аортального клапана	39

2.2.11. Выделение РНК из клеточных культур	39
2.2.12. Обратная транскрипция	40
2.2.13. ПЦР в реальном времени	40
2.2.14. Статистическая обработка данных и построение графиков.....	41
3. РЕЗУЛЬТАТЫ	42
3.1. Динамика экспрессии остеогенов при индукции остеогенной дифференцировки и активации сигнального пути Notch	42
3.2. Сокультивирование эндотелиальных и интерстициальных клеток клапана аорты усиливает остеогенную дифференцировку клеток и активирует Notch.....	45
3.3. Активация сигнального пути Notch ведет к дозозависимому усилению остеогенной дифференцировки клеток.....	48
3.4. Различия между группами пациентов и здоровых людей по уровню активности сигнального пути Notch и про-остеогенным маркерам коллагену и периостину	50
4. ОБСУЖДЕНИЕ	52
ВЫВОДЫ	56
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	57

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИК – интерстициальные клетки аортального клапана

ЭК – эндотелиальные клетки аортального клапана

ТАК – трехстворчатый (трикуспидальный) аортальный клапан

БАК – двухстворчатый (бикуспидальный) аортальный клапан

HEK293T – клетки эмбриональной почки человека

PBS (phosphate buffer saline) – фосфатно-солевой буфер

α -MEM (α minimum essential medium) – минимальная питательная среда

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) – модифицированная минимальная питательная среда

P/S – пенициллин/стрептомицин

TAE – триацетатный буфер для электрофореза

FBS (fetal bovine serum) – фетальная коровья сыворотка

BSA (bovine serum albumin) – бычий сывороточный альбумин

HEY1 (hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein1) – ген-мишень сигнального пути Notch

NICD (Notch intracellular domain) – внутриклеточный домен рецептора Notch1

Jagged1,2 (Jag1,2) – лиганды сигнального пути Notch, принадлежащие к семейству DSL (Delta/Serrate/LAG-2)

Delta-like1,3,4 (DLL1,3,4) – лиганды сигнального пути Notch, принадлежащие к семейству DSL (Delta/Serrate/LAG-2)

GFP (green fluorescence protein) – зеленый флуоресцирующий белок

BMP (Bone Morphogenic Protein) – костный морфогенетический белок

ВВЕДЕНИЕ

Кальцифицированный стеноз аортального клапана является третьей ведущей причиной сердечно-сосудистых заболеваний (Iung et al., 2003). Единственным существующим на сегодняшний день вариантом лечения является операция на сердце с имплантацией протеза клапана.

Риск возникновения кальцификации сердечного клапана увеличивается с возрастом (Stewart et al., 1997). Главной особенностью заболевания является прогрессивная минерализация ткани клапана. Механизмы, лежащие в основе этого процесса, остаются неясными, однако в последние годы стало понятно, что патологическая минерализация тканей сердца и сосудов имеет некоторые сходства с физиологическим процессом образования кости (Mathieu et al., 2014).

Створки аортального клапана состоят из интерстициальных клеток (ИК) и эндотелиальных клеток клапана (ЭК). Полагают, что интерстициальные клетки являются основными функциональными единицами в клапане, которые подвергаются минерализации (Rabkin-Aikawa et al., 2004). Однако, эндотелиальные клетки также могут принимать активное участие в минерализации (Hjortnaes et al., 2015; Cheng et al., 2013; Yao et al., 2013). В последнее десятилетие стало понятно, что прогрессирующий фиброз клапана и минерализация являются активными, а не пассивными процессами.

Notch – это ключевой сигнальный путь, играющий обширную роль в развитии, обеспечивающий перекрестное сообщение между различными типами клеток и их физиологической дифференцировкой (Andersson et al., 2011), и также он особенно важен в процессах формирования сердечно-сосудистой системы. Все рецепторы Notch (Notch1-4) и лиганды (Jag1 и 2 и Dll1, 3 и 4) экспрессируются в сосудистой системе. Активация Notch-рецепторов требует их связывания с трансмембранным лигандом, представленным на соседних клетках. Это связывание вызывает серию последовательных протеолитических расщеплений в рецепторе, что в конечном итоге приводит к высвобождению активированного внутриклеточного домена рецептора Notch (Notch intracellular domain – NICD), который является транскрипционно активной формой Notch. NICD транслицируется в ядро, где он регулирует широкий спектр генов-мишеней (Andersson et al., 2011).

Существующие данные о роли Notch в кальцификации аортального клапана довольно противоречивы. *Notch1* может ингибировать кальцификацию аортального клапана (Acharya et al., 2011). Однако имеются противоположные данные, свидетельствующие о том, что *Notch1* может поддерживать остеогенную дифференцировку в человеческих ИК (Zeng et al., 2013). Гаплонедостаточность по *NOTCH1* способствует, согласно исследованиям одной группы, экспрессии про-остеогеннов и генов, отвечающих за развитие воспалительных процессов (Theodoris et al., 2015).

Таким образом, целью данной работы стало изучить роль сигнального пути Notch в кальцификации аортального клапана человека.

Для достижения указанной цели, были поставлены следующие экспериментальные задачи:

- Выявить гены, экспрессирующиеся на начальных этапах остеогенной дифференцировки
- Изучить влияние межклеточных взаимодействий между эндотелиальными и интерстициальными клетками на остеогенную дифференцировку
- Изучить эффект активации Notch на остеогенную дифференцировку интерстициальных клеток аортального клапана
- Выяснить, существуют ли различия в уровне активации сигнального пути Notch и остеогенных генов между пациентами с кальцификацией аортального клапана и здоровыми людьми

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Формирование сердца в эмбриональном периоде

У эмбриона развитие сердца начинается со спецификации и миграции клеток из передней боковой пластинки мезодермы, в результате чего примерно на третьей неделе беременности у человека происходит образование сердечного полумесяца. Сразу после этого кардиопрогениторные клетки мигрируют вдоль вентральной средней линии, где они сливаются, формируя пульсирующую, линейную сердечную трубку. Эта первичная (ранняя) трубка состоит из внутреннего слоя эндокардиальных клеток, лежащих во внеклеточном матриксе (Abu-Issa, Kirby, 2007). Затем после правостороннего закручивания в первичном сердечном зачатке появляются предсердия (камеры притока) и желудочки (камеры оттока). В то же время, увеличение производства внеклеточного матрикса приводит к разбуханию ткани в определенных областях сердца, что инициирует формирование эндокардиальных подушек на атриовентрикулярном канале и отводном тракте (Markwald et al., 1977). Запуск образования эндокардиальной подушки опосредуется сигналами, исходящими из атриовентрикулярного канала и отводного тракта миокарда, которые распространяются по внеклеточному матриксу и достигают примыкающих эндокардиальных клеток, побуждая их претерпевать эндотелиально-мезенхимный переход (Laforest, Nemer, 2012a; Person et al., 2005).

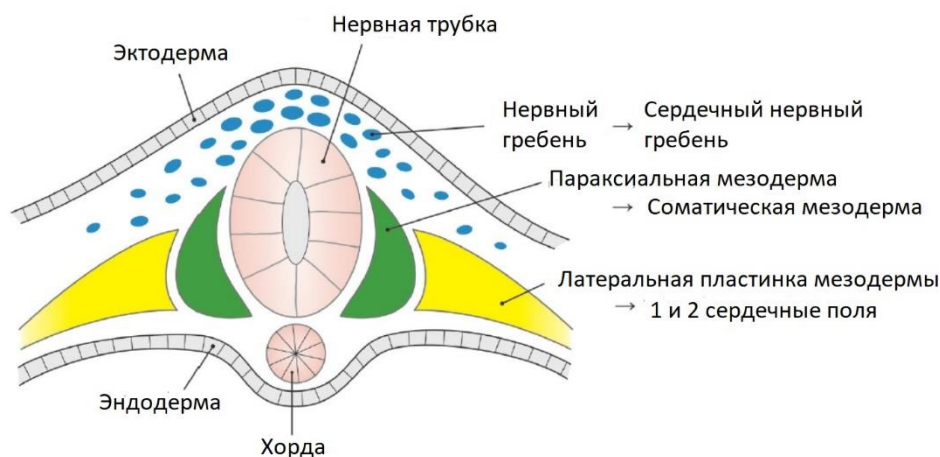


Рисунок 1. Происхождение в эмбриогенезе торакальной сосудистой сети и выносящего тракта. Эмбриональные первое и второе сердечные поля происходят из латеральной пластинки мезодермы. Это первое сердечное поле формирует раннюю сердечную трубку, в которую клетки из второго сердечного поля мигрируют, чтобы сформировать свернутое сердце. Сердечный нервный гребень происходит из клон клеток нервного гребня, которые мигрируют вдоль третьей и четвертой фарингеальных дуг для образования артерий головы и верхних конечности вместе с восходящей аортой и аортальной дугой. Легочная артерия образована из клеток нервного гребня, которые мигрируют вдоль шестой фарингеальной дуги (Yassine et al., 2017).

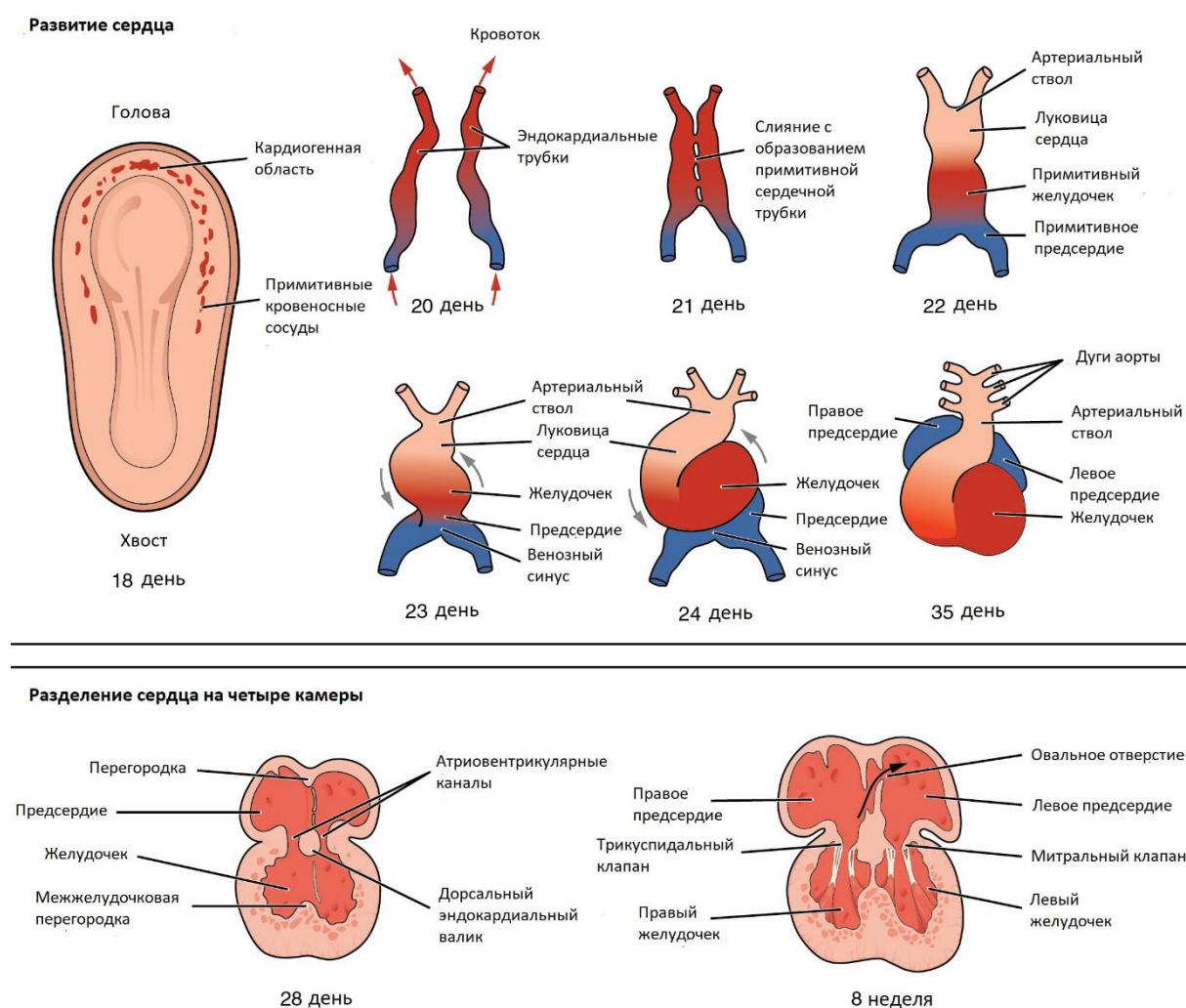


Рисунок 2. Развитие сердца в эмбриональном периоде.

Формирование эндокардиальной (сердечной) подушки — это сложный процесс, относящийся к трансформации эндокардиальных клеток в мезенхимные. Он осуществляется на границе атриовентрикулярного канала и инициирует формирование трикуспидального аортального клапана. В процессы эндотелиально-мезенхимного

перехода и морфогенеза сердечных подушек вовлечено большое количество транскрипционных факторов и сигнальных путей, включая гены, принадлежащие к семействам TGF- β , Wnt/ β -катенин, Notch, а также гены VEGF, ErbB, NFATc1, Twist-1, Sox9, Tbx20 и Gata4 (Chakraborty et al., 2010).

По мере развития в подушках происходят процессы клеточной пролиферации, что приводит к их росту до момента их соприкосновения. Это в свою очередь запускает процесс слияния между подушками. Дальнейшее ремоделирование эндокардиальных подушек приводит к образованию тонких, выступающих листков, состоящих из эндокардиальных клеток и внеклеточного матрикса, которые продолжают формировать клапаны. Эти последние этапы зависят от дифференцировки клеток, апоптоза и ремоделирования внеклеточного матрикса (Loffredo, 2000).

В период шестой – седьмой недели развития человека формируются четыре отдельных камеры сердца, а также аорта и легочная артерия, в результате чего появляется два разных круга кровообращения – лёгочный (малый) и системный (большой) (V Garg, 2006).

1.2. Развитие аортального клапана

Аортальный клапан находится на границе левого желудочка сердца и аорты – самой крупной артерии тела. Его основная задача – не допустить возвращения в желудочек крови, которая во время его сокращения ушла в аорту.

Аортальный клапан входит в состав корня аорты, состоящего из трех синусов Вальсальвы, трех межстворчатых треугольников Генле, трех полулунных створок, трех комиссур, фиброзного кольца, проксимальной и дистальной границей которого являются вентрикулоаортальное и синотубулярное соединение. Створки аортального клапана называются в зависимости от их расположения: левая полулунная (коронарная) створка, правая полулунная (коронарная) створка и задняя (некоронарная) створка аортального клапана (Misfeld, Sievers, 2007). У взрослых диаметр отверстия клапана – 2,0-2,3 см, площадь отверстия 2,5-3,0 см, площадь створок 4,0-5,0 см. В левом и правом синусах Вальсальвы находятся устья соответствующих коронарных артерий. Створка клапана состоит из четырех компонентов: тело, основание, поверхность кооптации (смыкания), узелки Аранци (утолщение треугольной формы в зоне кооптации). Створки представляют собой тонкие (< 1 мм), гибкие, аваскулярные структуры, состоящие из трех слоев:

желудочкового (*ventricularis*), аортального (*fibrosa*) и спонгиозного (*spongiosa*) (Butcher et al., 2011). С аортальной и желудочковой сторон створки покрыты монослоем эндотелиальных клеток (ЭК). Была показана уникальная морфология этих клеток по сравнению с ЭК, выстилающими артерии и вены, основанная на способности реагировать на изменения гемодинамики (Butcher et al., 2011; Schoen, 2012). Эндотелиальные клетки аорты располагаются так, чтобы их главная ось была перпендикулярна направлению растяжения сосуда (круговое), то есть параллельно направлению кровотока. Для ЭК клапана главным направлением растяжения является радиальное, и клетки будут располагаться перпендикулярно направлению кровотока (Butcher, Nerem, 2007). Аортальный слой (*fibrosa*) преимущественно содержит коллагеновые волокна, ориентированные в круговом направлении в виде пучков и тяжей, и небольшого количества эластических волокон (Butcher et al., 2011). Коллагеновые волокна в теле створки, отходящие под углом 45 градусов от фиброзного кольца, имеют направление полу эллипса и заканчиваются на противоположной стороне. В зоне кооптации свободного края этот слой присутствует в виде отдельных пучков. Коллагеновые пучки в этой зоне подвешены между местами фиксации комиссур на внутренней поверхности аорты под углом 125 градусов относительно стенки аорты. Подобная ориентация коллагеновых волокон предназначена для перераспределения нагрузки со створок на фиброзное кольцо во время диастолы (Орловский П.И., Гриценко В.В., 2007). Более тонкий желудочковый (*ventricularis*) слой содержит гораздо большее количество эластических волокон по сравнению с аортальным. Более того, оба компонента желудочкового слоя – эластические и коллагеновые волокна в ненагруженной створке находятся в гораздо менее организованном состоянии. Спонгиозный слой (*spongiosa*) содержит большое количество гликозамингликанов и протеогликанов. Между всеми компонентами внеклеточного матрикса в трех слоях находятся интерстициальные клетки клапана (ИК) Эта гетерогенная группа клеток с уникальными характеристиками необходима для поддержания функции и гомеостаза клапана посредством пролиферации, секреции матриксных металлопротеиназ и компонентов внеклеточного матрикса (Schoen, 2012).

1.3. Развитие двухстворчатого аортального клапана

Нарушения в развитии эндокардиальной подушки может привести к заболеваниям клапанов сердца, включая развитие такого фенотипа, как двухстворчатый (бикуспидальный) аортальный клапан (БАК) (Loffredo, 2000).

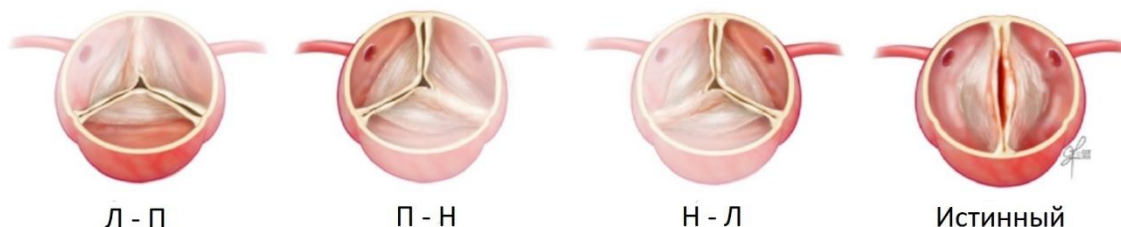


Рисунок 3. Иллюстрации истинного бикуспидального аортального клапана и трехстворчатого клапана со слиянием двух из трех створок (Masri et al., 2017).

Это одна из широко распространенных сердечных аномалий, которая поражает около 2% взрослых людей, в соотношении между мужчинами и женщинами 4:1 (Ward, 2000). Формирование бикуспидального аортального клапана является частью синдрома с различными фенотипами, который включает в себя истинную двухстворчатость или же наличие трех створок со слиянием двух из них (Braverman et al., 2005). Проявление подобной патологии может протекать как полностью бессимптомно, так и с проявлением симптомов различной тяжести. Как следствия этого дефекта развития клапана могут возникать такие состояния, как сглаживание аортального клапана, аортальный стеноз, аортальная дилатация (расширение аорты) или их комбинации (Masri et al., 2017).

Наиболее часто встречающийся подтип бикуспидального аортального клапана – тот, при котором наблюдается сращение правой и левой коронарных створок (59% всех случаев); те, у кого едина правая и некоронарная створки составляют 37% всех случаев (Friedman et al., 2008). Недавнее исследование показало, что бикуспидальный аортальный клапан со сращенными правой и некоронарной створками, а также со сращенными правой и левой створками имеют разную этиологию образования. Остается спорным вопрос о том, может ли морфотип двухстворчатого аортального клапана (т.е. паттерны сращения створок) предсказать прогрессию дисфункции аортального клапана или развитие аневризмы аорты (Laforest, Nemer, 2012). В недавнем исследовании оценивали прогностическую картину у пациентов с наличием шва сращения по сравнению с пациентами без шва. Иногда достаточно сложно отличить врожденный двухстворчатый аортальный клапан от

приобретенного «двухстворчатого» (например, постревматического) клапана. В таких случаях прибегают к гистологическому анализу шва: при врожденном двухстворчатом аортальном клапане шов богат эластическими волокнами, тогда как в постревматическом и поствоспалительных швах присутствует больше коллагеновых волокон (Ladich et al., 2011). Данное исследование показало, что присутствие линии слияния створок ассоциировалось с более высоким процентом тяжелых аортальных стенозов, недостаточностью и, как итог, необходимостью хирургической замены аортального клапана.

Исследуя феномен наследования бicuspidального аортального клапана на популяциях, было установлено, что данное заболевание носит характер аутосомно доминантного наследования с редуцированной пенетрантностью и различными вариантами экспрессии.

Хотя наследуемость бicuspidального аортального клапана сейчас хорошо установлена, гены, связанные с этим дефектом, остаются в значительной степени неизвестными (Giusti et al., 2017). Наследственный анализ с использованием микросателлитных маркеров выявил связь с тремя локусами на хромосомах 18q, 5q и 13q, но точные гены в этих областях не были определены. На сегодняшний день только мутации в гене *NOTCH1*, который находится на хромосоме 9q34-35, были связаны с формированием фенотипа двухстворчатого аортального клапана (Vidu Garg et al., 2005; Giusti et al., 2017). Остальные гены, найденные на сегодняшний день, связаны с обширными синдромами, частью которых являлось формирование бicuspidального аортального клапана.

Мутации в транскрипционном факторе *GATA6* связаны с врожденными дефектами сердца, включая тетраду Фалло. *GATA6* участвует в морфогенезе сердца, и его делеция в клетках нежного гребня приводит к летальному исходу в перинатальном периоде. Эксперименты на мышах говорят о том, что *gata6* является геном-кандидатом, участвующим в формировании бicuspidального аортального клапана (Kodo et al., 2009; Maitra et al., 2010). Также было показано, что мутации в рецепторах, приводящие к дисрегуляции TGF- β сигнального пути, участвуют в формировании двухстворчатой морфологии клапана (Girdauskas et al., 2011; Ng et al., 2004).

Было показано, что изменения в экспрессии генов, кодирующих те или иные компоненты внеклеточного матрикса (эластин, коллаген и протеогликаны) могут приводить к дефектам сердца. Например, мутации в *FBNI* (гликопротеин внеклеточного матрикса, который необходим для поддержания эластичности ткани створок клапана и стенки аорты, действует путем связывания гладкомышечных клеток с соседними эластиновыми фибриллами) наблюдались у пациентов с синдромом Марфана, генетическим заболеванием

соединительной ткани, характеризующимся пролапсом митрального клапана, формированием двухстворчатого аортального клапана, диссекцией аорты и аневризмой (Dietz & Pyeritz, 1995; Robinson et al., 2002). Более того, известно об уменьшении экспрессии *FBNI* в ткани аорты у пациентов с бicuspidальным аортальным клапаном (Fedak et al., 2003). Следует отметить, что целенаправленная делеция *fbn1* у мышей приводит к фенкопии дефектов, наблюдаемых при синдроме Марфана, что указывает на причинную связь между мутациями в *FBNI* и мальформацией клапана (Pereira et al., 1997, Pereira et al., 1999).

Аортальная дилатация, диссекция (рассечение) и аневризма аорты являются наиболее распространенными сосудистыми осложнениями у пациентов с бicuspidальным аортальным клапаном (Laforest, Nemer, 2012b). Анализ сцепленности, проводимый у 7 членов семьи с аневризмой аорты и диссекцией, из которых трое имели двухстворчатый клапан, выявил мутации в гене *ACTA2*, который кодирует гладкомышечный α -актин (D.-C. Guo et al., 2007). Анализ тканей аорты у таких пациентов показал повышенное накопление протеогликанов, фрагментацию и потерю эластических фибрилл, уменьшение количества гладкомышечных клеток, что свидетельствует о дегенерации стенки аорты. Тем не менее, вызывает ли мутация *ACTA2* формирование бicuspidального аортального клапана, остается неизвестным (Regalado et al., 2015).

Например, гомозиготные укорачивающие мутации в *HOXA1* связывают с синдромом Босли-Салиха-Алораини и синдромом Дисгенеза Атабаскан-Брейнстем (Tischfield et al., 2005).

Интересно, что при наличии этих синдромов наблюдаются тяжелые сердечно-сосудистые мальформации, включающие такие аномалии, как формирование прерывистой дуги аорты типа В, aberrантной подключичной артерии, дефекта межжелудочковой перегородки, тетрады Фалло и бicuspidального аортальный клапан. Показано, что таргетная инактивация *hoxa1* у мышей приводит к тем же дефектам (Makki, Caracchi, 2012). Среди сердечных мальформаций развитие двухстворчатого аортального клапана было получено с распространенностью 24%. Будут ли обнаружены мутации в *HOXA1* у пациентов с бicuspidальным клапаном все еще остается неясным.

Аналогично, гетерозиготные миссенс мутации в калиевом канале *KCNJ2* были связаны с синдромом Андерсена (Andelfinger et al., 2002). Это редкое заболевание характеризуется наличием таких симптомов, как пролонгация QT интервала с желудочковыми аритмиями, периодический паралич, дисморфическая фация, расщепленное нёбо и сколиоз. Дополнительными особенностями, которые наблюдались в семейном анамнезе, являлись

сердечно-сосудистые мальформации, в том числе формирование бicuspidального аортального клапана, бicuspidального клапана с коарктацией аорты или легочным стенозом, который ранее никогда не связывали с этим заболеванием. Остается неизвестным, вызвано ли развитие бicuspidального аортального клапана этой или другой, до сих пор не охарактеризованной мутацией. Связь между дефектным током калия и неправильным развитием аортального клапана до сих пор не исследована (Laforest, Nemer, 2012).

1.4. Генетические механизмы формирования бicuspidального аортального клапана (БАК)

У человека формирование бicuspidального аортального клапана связывают с редкими, но высоко пенетрантными экзонными вариантами в *NOTCH1*, *EGFR*, *ENG*, *GATA5*, *NKX2-5*, *NOS3*, *PDIA2*, *TEX26*, *TGFBR2*. Кроме того, наличие БАК совместно с дилатацией восходящего отдела аорты ассоциируют с редкими вариантами в *NOTCH1*, *AXIN1*, *TGFBR2*, *FBN1*, *SMAD2*, *NOS3*, *ACTA2*, *TGFB2* и других генах. На сегодняшний день единственным геном, содержащим частые варианты, связанные с БАК, является *GATA4* (Yang et al., 2017), но этот ген не связан с развитием дилатации восходящего отдела аорты. Более 40 генов считают ответственными за формирование бicuspidального аортального клапана (Wu et al., 2017). Приблизительно 30 генов ассоциируют с образованием дилатации аорты среди общей популяции, но многие из них являются редкими вариантами экзонов, обнаруженными лишь у нескольких семей или индивидуумов (Brownstein et al., 2017). Большинство из них кодирует белки, участвующие в наработке и поддержании компонентов внеклеточного матрикса (*BGN*, *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A1*, *COL5A2*, *EFEMP2*, *ELN*, *EMILIN1*, *FBN1*, *FBN2*, *FLNA*, *LOX*, *MFAP5*), сокращения и метаболизме гладкомышечных клеток сосудов (*ACTA2*, *MYH11*, *FOXE3*, *MAT2A*, *MYLK*, *PRKG1*); или в сигнальном пути TGF- β (*FBN1*, *SKI*, *SLC2A10*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4*, *TGFB2*, *TGFB3*, *TGFBR1*, *TGFBR2*). Практически четверть пациентов с дилатацией восходящего отдела аорты имеет мутацию в одном из этих генов. Редкие или необычные мутации в шести из этих генов (*AXIN1*, *ELN*, *FBN1*, *NOS3*, *NOTCH1* и *TGFBR2*) были связаны с дилатацией аорты у пациентов с бicuspidальным аортальным клапаном. Таким образом, маловероятно, что эти гены ответственны за значительную долю случаев развития дилатации аорты, наблюдаемую при данном заболевании клапана. Однако, показано, что *FBN1* имеет

варианты, которые связывают с образованием дилатации восходящего отдела аорты у пациентов с БАК. Учитывая выполняемые им одновременно структурные функции и его роль в TGF- β сигналинге, *FBNI* является геном-кандидатом, принимающим участие в развитии заболевания (Girdauskas et al., 2017; D.-C. Guo et al., 2016; LeMaire et al., 2011; Pepe et al., 2014).

Таким образом, все большее погружение в изучение генетики человека дает результаты, поддерживающие гипотезу о том, что в механизмы наследования бicuspidального аортального клапана вовлечено множество причинно-следственных генов, и большинство из них еще предстоит идентифицировать (Giusti et al., 2017; Laforest, Nemer, 2012).

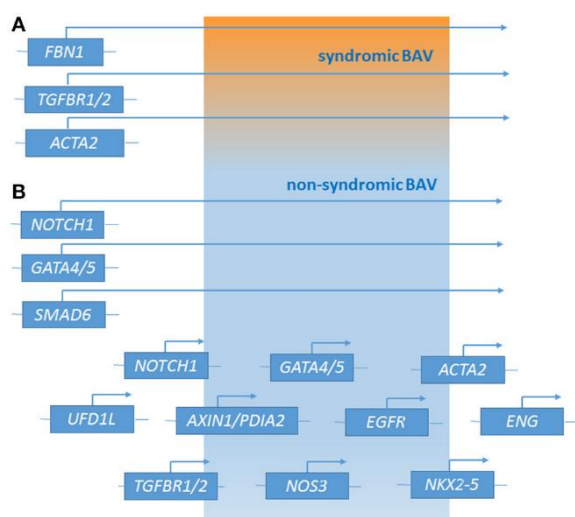


Рисунок 4. Генетические локусы, связанные с формированием БАК, являющимся частью синдрома (А) и БАК, как отдельный дефект клапана (В) (эффект основных генов или вклад множественных второстепенных локусов (полигенная форма заболевания) (Giusti et al., 2017).

С течением времени у пациентов с двухстворчатым аортальным клапаном могут появляться и прогрессировать симптомы различной тяжести, связанные с кальцификацией клапана, что способствует возникновению аортального стеноза в 72% случаев и аортальной регургитации, что в конечном итоге может привести к необходимости хирургического вмешательства.

На эхокардиографии у таких пациентов со стенотическим бicuspidальным аортальным клапаном можно наблюдать, что сам аортальный клапан анатомически значительно больше, чем его эффективно работающие участки. Гидродинамические характеристики

проходящего тока крови значительно отличаются у пациентов со стенотическим двухстворчатым клапаном по сравнению с кальцинированным трикуспидальным клапаном, что говорит о потере двухстворчатым клапаном его функциональных возможностей в гораздо большей степени, нежели при наличии у пациента трехстворчатой морфологии клапана.

1.5. Аортальный стеноз

Будучи следствием идиопатического кальциноза, морфологически аортальный стеноз проявляется в виде утолщений, фиброза и кальциноза полулунных створок. При такой этиологии возраст развития стеноза составляет около 60 лет. Развитие стеноза на двухстворчатом аортальном клапане проявляется гораздо раньше, чем на трехстворчатом, как полагают, ввиду избыточной турбулентности потока крови, проходящего сквозь небольшое отверстие аорты, что способствует усиленной травматизации клапана и необходимости его хирургической замены в возрасте в среднем около 45 лет. (Кэмм, 2011; Новиков, 2015).

Основными причинами развития стеноза клапана аорты в большинстве случаев служат дегенеративные заболевания, в молодом возрасте нередкой причиной является ревматическое поражение сердца. Среди прочих причин выделяют семейную гиперхолестеринемию, гиперпаратиреоз, болезнь Педжета, дислипидемию, системную красную волчанку (Кэмм, 2011; Новиков, 2015).

На сегодняшний день мнение о пассивном процессе дегенерации, лежащем в основе развития стеноза, сменилось на наличие динамического сложно-регулируемого клеточно-молекулярного патологического процесса в аортальном клапане, который приводит к описываемому дефекту. Условно сам механизм развития аортального стеноза можно представить, как трехступенчатый процесс, включающий первичное воспаление, вторичный фиброз и кальциноз, как конечную стадию развития стеноза (Dweck et al., 2012). В свою очередь, в процессе развития кальциноза аортального клапана принято также выделять несколько стадий: аортальный склероз (стадия легкой кальцификации) – уплотнение и утолщение створок клапана с локальными участками кальцификации, без слияния комиссур и без выраженной обструкции выходного отдела левого желудочка. В дальнейшем аортальный склероз может переходить в стадию умеренной кальцификации и,

наконец, в третью стадию, тяжелую кальцификацию створок, сопровождающуюся обструкцией выходного отдела левого желудочка, единственным эффективным методом лечения которой на сегодняшний день является протезирование (Guerraty, Mohler, 2007; Otto et al., 1999).

Исследования последних лет установили, что в процессе кальцификации аортального клапана участвуют гидроксиапатиты, которые откладываются на коллагеновом матриксе, белок остеопонтин и другие белки костного матрикса (Yetkin, Waltenberger, 2009). Существует несколько терминов для описания процесса кальцификации аортального клапана, один из них – эктопическая кальцификация (т.е. отложение кальция в не костных тканях). Эктопическая кальцификация возникает, когда кальций и фосфаты, которые находились в растворенном состоянии во внеклеточной жидкости, кристаллизуются с образованием гидроксиапатита – того же кристалла, который составляет основную часть кости). Очагом для начала кальцификации служат везикулы, образовавшиеся из клеток, подвергшихся апоптозу (Emile R. Mohler, 2004). Обычно кальцификация начинается на створках около их места прикрепления к аорте и в области, близлежащей к месту их соприкосновения. Известно, что гораздо в большей степени кальцификации подвержена аортальная поверхность клапана, нежели желудочковая, что объясняется различием в паттернах экспрессии генов на аортальной и желудочковой сторонах (Ladich et al., 2011).

1.6. Механизмы оссификации и кальцификации тканей

Оссификация – это процесс закладки нового костного материала, в то время как кальцификация представляет собой процесс, посредством которого соли кальция накапливаются в мягких тканях, что заставляет их затвердевать. Многие из ключевых игроков, принимающих участие в кальцификации сосудов (моноциты, факторы транскрипции, BMP и т. д.), также являются регуляторами формирования костной ткани в осевом скелете. Считается, что оссификация сосудов развивается из кальцификации (Fuegy et al., 2017).

Существует три основных типа сосудистой кальцификации: кальцификация медиального слоя артерий; атеросклероз интимы и кальцификация, наблюдаемая при хроническом заболевании почек.

Атеросклероз интимы характеризуется образованием эксцентричной атеросклеротической бляшки с последующим разрастанием гладких мышц интимы (внутренний слой), приводящим к сужению просвета сосуда. Кальцификация медиального слоя артерий относится к концентрической кальцификации, в результате чего происходит ожесточение медиального слоя стенки артерии. Это состояние обычно протекает бессимптомно, но увеличивает предрасположенность пациентов к ряду патологических состояний сердца и почек (Fuery et al., 2017).

Кальцификация, наблюдаемая у пациентов с хроническим заболеванием почек, обычно обладает признаками как кальцификации медиального слоя, так и атеросклероза интимы. Как правило, кальцификация медиального слоя поражает средние и мелкие периферические артерии, в то время как кальцификация интимы затрагивает коронарную и сонную артерии.

Существует два типа формирования кости: формирование эндохондральной кости, которое включает хондрогенез и развитие хрящевого промежуточного продукта, а также внутримембранное формирование кости, которое прогрессирует от прямой дифференцировки мезенхимных стволовых клеток в остеобласты, формирующие кость. Оссификация атеросклеротической бляшки в интима в первую очередь включает процесс формирования эндохондральной кости, тогда как оссификация медиального слоя происходит по большей части через внутримембранный процесс (Vattikuti, Towler, 2004a). Однако при продвинутой кальцификации были найдены остатки хряща даже при оссификации медиальной оболочки (Qiao et al., 2003). Кальцификация клапанов, по-видимому, включает как внутримембранные, так и эндохондральные процессы (Mohler et al., 2001; Otto et al., 1994).

1.7. Молекулярные механизмы кальцификации

Кальцификация сосудов развивается в ответ на хронические воспалительные стимулы, которые в избытке присутствуют в организме людей, страдающих диабетом, гипертонией, гиперлипидемией и хронической болезнью почек (Shao et al., 2006; Zimmet et al., 2001). Эта кальцификация может прогрессировать и сформировать участки оссификации, занимающие 15-20% зоны поражения (Hunt et al., 2002; Jeziorska et al., 1998; E R Mohler et al., 2001; Soor et al., 2008). Механизмы оссификации сосудов все еще находятся на стадии исследования, но, как было показано, они варьируют в зависимости от лежащих в основе

данной патофизиологии процессов кальцификации, предшествующих окостенению тканей (L. L. Demer, Tintut, 2014; Linda L Demer, Tintut, 2008; Vattikuti, Towler, 2004b).

Кальцификация артерий является активным процессом, контролируемым клетками, которые способствуют оксификации посредством экспрессии остеогенных факторов роста, белков матрикса и других молекул, ассоциированных с формированием кости, которые обычно экспрессируются остеобластами в костной ткани (K. Boström et al., 1993; Canfield et al., 1996; Proudfoot et al., 1998). Гипотезы происхождения остеобласто-подобных клеток при кальцификации сосудов весьма противоречивы, но одна из возможных версий заключается в том, что эти клетки происходят из самой стенки сосуда. Альтернативная версия предполагает происхождение остеобласто-подобных клеток из эндогенно циркулирующих мезенхимных предшественников, таких, какими являются некоторые субпопуляции CD14 моноцитов, обладающие аналогичным потенциалом (Kuwana et al., 2003). Еще одна вероятная гипотеза заключается в том, что сами эндотелиальные клетки претерпевают эндотелиально-мезенхимный переход и остеогенную дифференциацию (Cheng et al., 2013; Linda L Demer, Tintut, 2008; J. Yao et al., 2015).

Кальцификация клапанов сердца возникает в результате повреждения эндотелия, отложений холестерина и воспаления, которое приводит к дистрофической кальцификации (Bostrom et al., 2011; Leopold, 2012; E R Mohler et al., 2001). Кальцифицирующиеся клетки клапана инициируют образование ткани, подобной кости, посредством внутримембранной оксификации, эндохондральная оксификация также способствует этому, хоть и в меньшей степени (Egan et al., 2011). По-видимому, данный процесс опосредуется продукцией BMP2 и BMP4 наравне с остеопontiном, остеокальцином и остеонектином. Макрофаги и Т-клетки присутствуют в оксифицированных клапанах даже на ранних стадиях поражения (Hruska et al., 2005). Количество тучных клеток также велико и, как считается, они способствуют процессам неоангиогенеза, продуцируя VEGF (Wallby et al., 2002).

Несомненно, что формирование кости зависит от неоваскуляризации. Как и в развитии костей у эмбриона, процессы ангиогенеза и остеогенеза тесно связаны. Образование эндохондральной кости и ангиогенез зависят от экспрессии Runx2, который функционирует в тандеме с Sox9 (Vattikuti, Towler, 2004b). В процессе раннего скелетообразования, фактор HIF1 α (Hypoxia induced factor 1 α) поддерживает дифференцировку прехондрогенных клеток путем регулирования Sox9. Стабилизация белка HIF1 α в конечном счете приводит к увеличению экспрессии VEGF, что способствует ангиогенезу (Syvaranta et al., 2010). HIF1 α также активирует BMP2 в остеобластах (Schipani et al., 2009).

Весьма вероятно, что сигнальный путь BMP играет важную роль в патогенезе кальцифицированного аортального клапана (рис. 5). В экспериментальных моделях, активированные эндотелиальные клетки, как было показано, секретируют BMP2 и BMP4 в ответ на изменения паттерна ламинарного потока крови, также BMP2 был обнаружен в интерстициальных клетках, полученных из аортального клапана пожилых крыс (Chang et al., 2007; Seya et al., 2011; Sorescu et al., 2004). Белки BMP стимулируют кальцификацию посредством активации Smad и Wnt/ β -катенин сигнальных путей, а также повышая экспрессию остеохондрогенного транскрипционного фактора Msx2. Эти сигнальные пути конвергируют, чтобы индуцировать экспрессию транскрипционного фактора Runx2 (K. I. Boström et al., 2011). Когда экспрессируется Runx2, клетки вступают на путь дифференцировки в остеобласты, повышается экспрессия связанных с кальцификацией белков, включая остеопонтин, костный сиалопротеин II и остеокальцин, таким образом осуществляется кальцификация (Johnson et al., 2006).

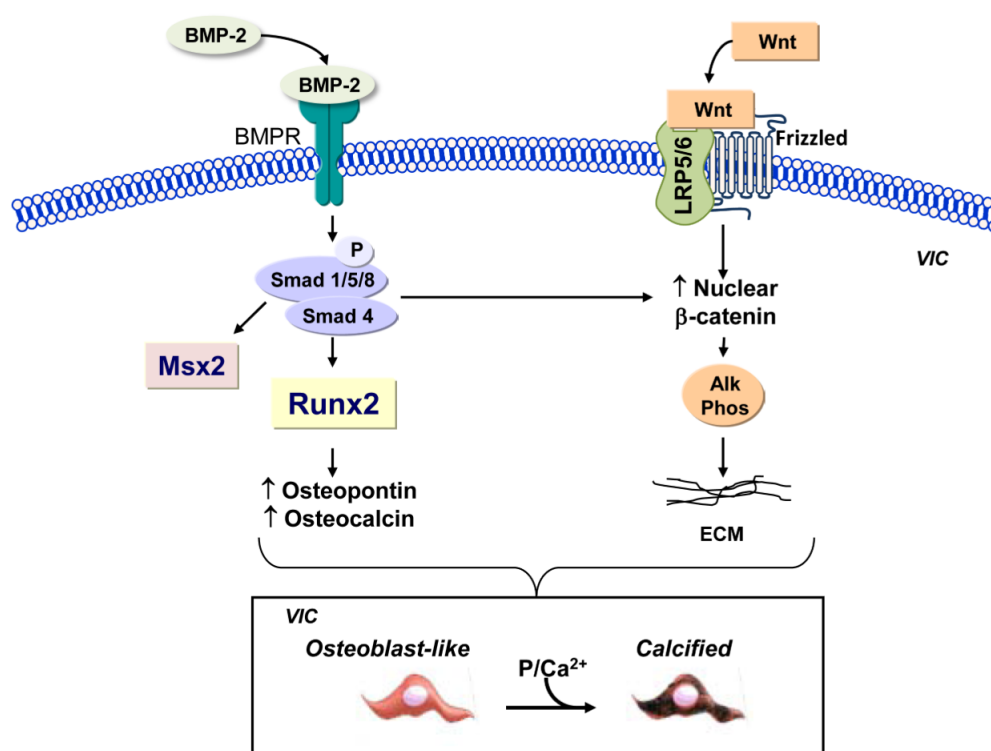


Рисунок 5. Сигнальные пути, осуществляющиеся в интерстициальных клетках клапана, опосредующие приобретение клетками osteo-фенотипа. (Leopold, 2012)

BMP также активирует сигнальный путь Wnt/ β -катенин, что усиливает экспрессию щелочной фосфатазы, которая также необходима для развития кальцификации (K. I. Boström et al., 2011). Белки Wnt принадлежат к семейству секретируемых липид-модифицированных полипептидных лигандов, которые связываются с рецепторными

комплексами frizzled белок/липопротеиновый рецептор-ассоциированный белок (Lgr) 5 или 6, что приводит к накоплению β -катенина в ядре. Активация этого сигнального пути в экспериментальных моделях кальцифицированного аортального клапана и эксплантированных клапанах человека была подтверждена наблюдаемой экспрессией Wnt-лиганда Wnt3a, ко-рецептора липопротеинов рецептор-связанного белка 5 и ядерного β -катенина в кальцифицированной ткани клапана (Caira et al., 2006; Miller et al., 2008; Rajamannan, 2010).

В местах оссификации также было установлено наличие резорбирующих кость остеокласто-подобных клеток (Mikhaylova et al., 2007). В мышинных моделях, оксидативный стресс, как было показано, индуцирует экспрессию гена *rankl* в гладкомышечных клетках сосудов посредством *runx2* (Massy et al., 2008). Было показано, что окисленные липиды также вызывают повышение активности *RANKL* в клетках человека (Byon et al., 2011). Поэтому, аналогично ортотопическому формированию кости, оссификация сосудов, вероятно, является активным процессом, который включает в себя непрерывное ремоделирование тканей.

В организме про-кальцифицирующие процессы уравниваются локальными и циркулирующими ингибиторами кальцификации. Предположительно, снижение экспрессии или активности этих медиаторов может также способствовать развитию патологической кальцификации в сердечно-сосудистой системе. Матриксный Gla-белок (MGP), γ -богатый карбоксиглутаминовой кислотой и витамин К-зависимый белок, предотвращают кальцификацию путем ингибирования BMP сигналинга (Y. Yao et al., 2010). Было показано, что уровень MGP значительно ниже у пациентов с кальцификацией аортального клапана по сравнению с лицами без патологии (Koos et al., 2009). Эти данные свидетельствуют о том, что уменьшение экспрессии или активности MGP может способствовать прогрессии развития кальцификации аортального клапана. Активность MGP зависит от статуса карбоксилирования и доступности витамина К.

Fetuin-A представляет собой белок, полученный из печени, который является мощным циркулирующим ингибитором кальцификации (Jahnen-Dechent et al., 2011). Fetuin-A действует путем связывания депозитов кальция и фосфата, стабилизируя эти ионы и предотвращая их поглощение клетками. Известно, что дефицит fetuin-A связан с развитием кальцификации мягких тканей в экспериментальных моделях, а также уровень fetuin-A в сыворотке крови пациентов с кальцификацией аортального клапана ниже по сравнению с контрольной группой (Jahnen-Dechent et al., 2011; Kaden et al., 2007).

Таким образом, эти данные показывают, что ремоделирование клапана и его кальцификация происходят путем активации про-кальцифицирующих клеточных и молекулярных процессов, и что активности циркулирующих ингибиторов кальцификации недостаточно для предотвращения кальцификации аортального клапана.

1.8. Эндотелиально-мезенхимный переход

Основная функция эндотелиальных клеток клапана заключается в поддержании гомеостаза клапана; однако, эндотелий клапана также может претерпевать дифференцировку в остеобласто-подобные клетки в результате эндотелиально-мезенхимального перехода. Во время этого процесса эндотелиальные клетки утрачивают свои свойства, они перестают экспрессировать специфичные эндотелиальные маркеры, такие как сосудистый эндотелиальный кадгерин, приобретают фенотипические характеристики мезенхимных клеток или миофибробластов и начинают экспрессировать α -гладкомышечный актин, коллаген I типа и виментин (Kovacic et al., 2012; Piera-Velazquez et al., 2011). Эти «трансформированные» ЭК также демонстрируют повышенную подвижность и могут мигрировать в окружающие ткани (Piera-Velazquez et al., 2011). Это явление может быть индуцировано выработкой ростового фактора TGF- β , транскрипционного фактора Msx2 и белков сигнального пути β -катенина. Каждый из перечисленных компонентов присутствует в кальцифицированном клапане аорты.

После того, как ЭК претерпевают эндотелиально-мезенхимный переход, они могут начать принимать участие в процессе патологического фиброза клапана и/или подвергаться остеогенной дифференцировке, следуя тем же механизмам, что и ИК, подвергшиеся воздействию BMP. В результате они кальцифицируются, что вносит свой вклад в прогрессирование заболевания (K. I. Boström et al., 2011).

1.9. Сигнальный путь Notch и его компоненты

Notch – эволюционно-консервативный сигнальный путь, который регулирует определение клеточной судьбы, дифференцировку и гомеостаз тканей как в развитии, так и во взрослом организме (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Белки Notch представляют собой трансмембранные рецепторы с большим внеклеточным доменом, состоящим из различного

количества tandemных, так называемых, ЭПР-подобных повторов (то есть повторов, напоминающих таковые в эпидермальном факторе роста), за которыми следует более короткая, пронизывающая мембрану часть, и внутриклеточный домен рецептора (NICD), который содержит домен, активирующий транскрипцию (рис. 6). Белки Notch подвергаются процессированию в аппарате Гольджи путем протеолитического расщепления фурино-подобной конвертазой (S1 расщепление) (Logeat et al., 1998), тогда как сахара добавляются к ЭПР-подобным повторам внеклеточного домена Notch различными гликозил-трансферазами, в том числе из семейства Fringe. Модифицированный Notch затем направляется к клеточной поверхности в качестве гетеродимера, части которого удерживаются нековалентными взаимодействиями. Находясь на поверхности клеточной мембраны внеклеточный домен рецептора доступен для взаимодействия с лигандами, принадлежащими к Delta (Dll1-4 у млекопитающих) или Jagged (Jag1 и Jag2) семействам. Эти лиганды экспрессируются на поверхности соседних клеток, и для обеспечения проведения сигнала необходим контакт клетка – клетка.

Происходит ли взаимодействие лиганд – рецептор Notch путем образования мономерных или же димерных мембранных комплексов, остается предметом дебатов (Kelly et al., 2010; Kopan, Pagan, 2009; Zanotti, Canalis, 2016). Продуктивность лиганд – рецепторного взаимодействия зависит от активности в клетке, передающей сигнал E3 убиквитин лигазы, например, mind bomb-1 (Mib1), которая убиквитинилирует находящийся в цитоплазме C-конец лиганда. Этот процесс необходим для осуществления эндоцитоза и эффективности проведения сигнального пути Notch (Itoh et al., 2003).

Эндоцитоз лигандов создает необходимую механическую силу, которая индуцирует конформационные изменения в рецепторе, приводящие к тому, что сайт S2 рецептора становится узнаваем ADAM белками (Brou et al., 2000; Meloty-Kapella et al., 2012; Mumm et al., 2000; Parks et al., 2000). После этого, оставшийся фрагмент Notch оказывается восприимчивым к расщеплению γ -секретазой (в сайте S3), что приводит к высвобождению NICD, который перемещается в ядро принимающей сигнал клетки (De Strooper et al., 1999; Kopan, Pagan, 2009b; Schroeter et al., 1998). Когда NICD высвобождается из клеточной мембраны, он может функционировать как фактор транскрипции (Kopan, 2002). В ядре NICD напрямую связывается с ДНК-связывающим белком CSL (CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1) (Jarriault et al., 1995). Взаимодействие NICD – CSL приводит к вытеснению ко-репрессоров и гистоновых деацетилаз, подавляющих экспрессию генов-мишеней в отсутствие сигнала Notch; и позволяет рекрутировать транскрипционный ко-активатор mastermind-like. Формирование CSL-NICD-mastermind-like – трёхкомпонентного

комплекса дает возможность привлечения дополнительных ко-активаторов для запуска транскрипции генов-мишеней, обычно кодирующих репрессоры, такие как основные-спираль-петля-спираль семейства транскрипционных факторов Hes и Hey (Iso et al., 2003). Тем не менее, спектр прямых мишеней Notch является весьма широким и тканеспецифичным, включая Snail1, p21, c-Myc, EphrinB2 и Nrarp (Grego-Bessa et al., 2007; Krebs et al., 2001; Rangarajan et al., 2001; Sahlgren, Gustafsson et al., 2008; Timmerman et al., 2004; Weng et al., 2006).

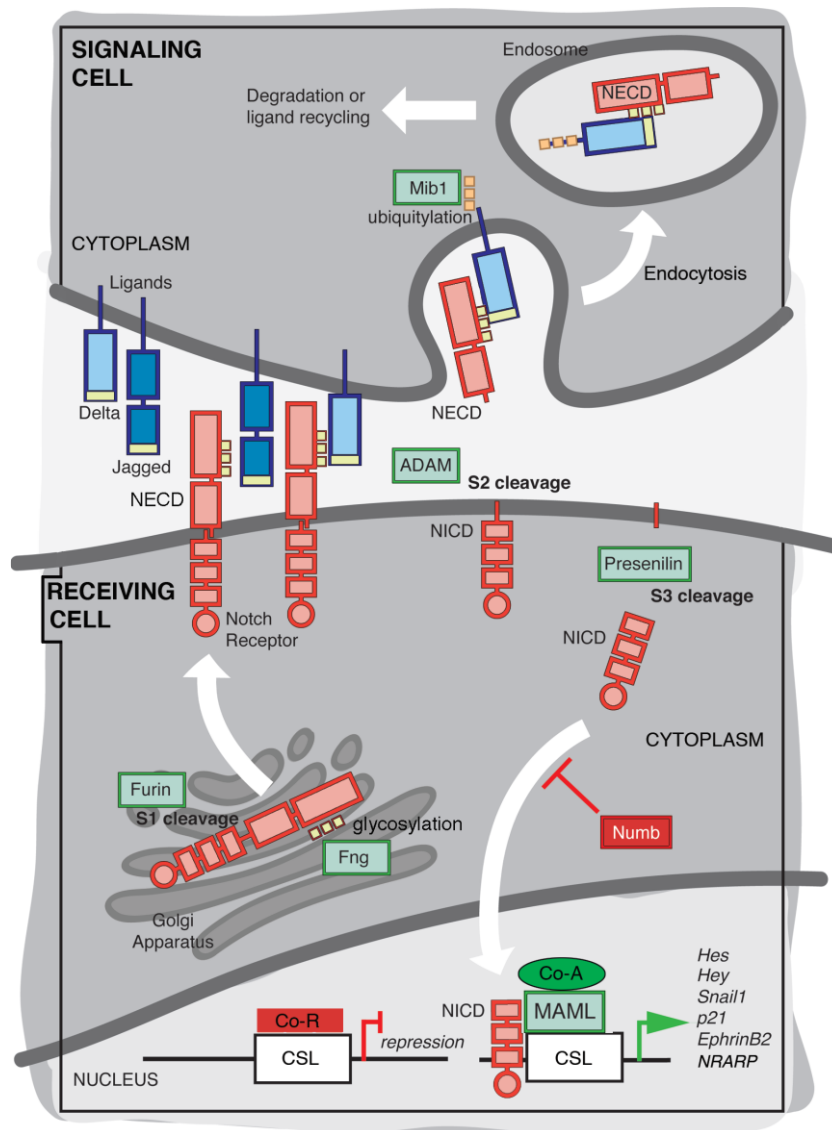


Рисунок 6. Сигнальный путь Notch (Luxán et al., 2016).

1.10. Участие сигнального пути Notch в развитии кальцификации аортального клапана

Сигнальный путь Notch играет ключевую роль в развитии, он обеспечивает перекрестное сообщение между различными типами клеток и их физиологическую дифференцировку (Andersson et al., 2011), и особенно важен во время развития и поддержания гомеостаза сердечно-сосудистой системы. В сосудистой системе экспрессируются все рецепторы Notch (Notch1-Notch4) и лиганды (Jag1 и Jag2 и Dll1, Dll3 и Dll4), хотя и на разных уровнях, и существуют данные о различиях в паттернах их экспрессии в разных клеточных типах и видах сосудов (Krebs et al., 2000). Результат активации Notch зависит от типа клеток и контекста, обеспечиваемого множеством возможных вариантов комбинаций рецепторов и лигандов, которые трансдуцируют различные биологические эффекты (Briot et al., 2016). Существует множество свидетельств того, что сигнальный путь Notch может играть важную роль именно во взрослом сердце, а также описано ключевое участие этого сигнального пути в патогенезе кальцификации аортального клапана (Vidu Garg et al., 2005; Irtyuga et al., 2017; Theodoris et al., 2015).

Известно, что механизмы, протекающие при кальцификации тканей клапана аорты сходны с процессами, наблюдаемыми при физиологической остеогенной дифференцировке клеток во время формирования кости, однако, ранние инициаторные механизмы, запускающие такую дифференцировку, остаются невыясненными. Остеогенная дифференцировка клеток представляет собой сложный, многоступенчатый процесс. Гены и кодируемые ими белки, принимающие участие в продвинутых стадиях остеогенной дифференцировки, относятся к семействам WNT, BMP и RUNX, которые в свою очередь, во многом, тем или иным образом находятся под контролем и регуляцией сигнального пути Notch. Расшифровка ранних механизмов запуска остеогенной дифференцировки как в норме, так и при патологической кальцификации важна с точки зрения возможности управления этой дифференцировкой – для предотвращения эктопической остео-трансформации клеток и минерализации тканей при различных патологических состояниях.

Точные механизмы, опосредующие участие Notch в кальцификации аортального клапана, остаются неизвестными, а существующие доказательства довольно противоречивыми. В лаборатории Сриваставы культивировали как овечьи интерстициальные клетки клапана, так и эндокардиальные клетки мышей. Используя трансгенную модель с гетерозиготным нокаутом Notch1, они показали, что у этих мышей развивался стеноз клапана.

Ингибирование Notch1 с помощью малых интерферирующих РНК (миРНК) или с использованием химического ингибитора DAPT приводило к увеличению экспрессии Runx2; однако этот эффект отменялся при одновременном использовании миРНК против BMP2. Таким образом, было продемонстрировано, что сигнальная передача Notch1 специфически влияет на остеогенные пути в интерстициальных клетках клапана, предотвращая прогрессирование остеогенной трансформации (Nigam, Srivastava, 2009). Данные о роли Notch в кальцификации аортального клапана были получены с помощью *Notch1*^{+/-} мышей. Важным аспектом в активации и сокращении миофибробласта является взаимодействие между α -гладкомышечным актином (α -SMA) и кадгерином-11 (Hutcheson et al., 2013). Мыши с генотипом *Notch1*^{+/-} имели минерализацию клапана аорты. Как это ни парадоксально, интерстициальные клетки клапана этих мышей обладали пониженной экспрессией как Runx2, так и α -SMA, при этом количество кадгерина-11 было повышено. *Notch1*^{+/-} ИК являются сверхчувствительными к механическому напряжению, так как растяжение стимулирует увеличение уровня α -SMA по сравнению с клетками дикого типа. Этот ответ, вероятно, объясняет наблюдаемую *in vivo* кальцификацию клапана у этих мышей. Notch1 использует миофибробластическую дифференцировку ИК и, таким образом, предотвращает дистрофическую минерализацию (J. Chen et al., 2015).

Кроме того, было показано, что подавление активности Notch ингибитором γ -секретазы в интерстициальных клетках аортального клапана крыс приводило к значительному снижению регуляции транскрипции фактора Sox9 наряду с несколькими хрящевыми генами. У свиней ингибирование Notch в ИК приводило к ускоренной кальцификации, тогда как стимуляция сигналов Notch ослабляла процесс минерализации. Добавление Sox9 в среду предотвращало кальцификацию, которая происходила при ингибировании Notch (Acharya et al., 2011).

Недавнее исследование с использованием эндотелиальных клеток, полученных *in vitro* из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, показало, что гаплонедостаточность по *NOTCH1* нарушает ответ эндотелиальных клеток на напряжение сдвига и активирует проостеогенную и воспалительную реакцию (Theodoris et al., 2015).

Казалось бы, что Notch является явным фактором, препятствующим процессам кальцификации. Тем не менее, существуют также данные о противоположном влиянии Notch на развитие заболевания. Так, недавно было отмечено, что Notch1 фактически способствует остеогенной дифференцировке и кальцификации интерстициальных клеток аортального клапана человека (Zeng et al., 2013).

Кроме того, полученные в нашей лаборатории данные, также свидетельствуют о противоположном эффекте, оказываемом активацией сигнального пути Notch на процессы

минерализации, протекающие в аортальном клапане. Индукция работы сигнального пути путем лентивирусной трансдукции клеток частицами, несущими компоненты Notch, приводила к усилению кальцификации интерстициальных клеток аортального клапана человека (A. Kostina et al., 2018). Эти разрозненные данные подчеркивают необходимость дальнейших исследований для выяснения патологических изменений, происходящих по причине нарушения работы сигнального пути Notch.

В нашей лаборатории ранее были получены данные о том, что активация работы сигнального пути Notch регулирует запуск остеогенной дифференцировки. Эти результаты были получены на клеточной модели мезенхимных стволовых клеток, а также были проведены предварительные эксперименты, свидетельствующие о роли Notch в приобретении интерстициальными клетками аортального клапана остео-фенотипа (Ignatieva et al., 2017; A. S. Kostina et al., 2016). Сигнальный путь Notch характеризует его многокомпонентность, тканеспецифичность, а также высокая дозозависимость. Notch принимает участие в контакте клеток между собой, а также опосредует множество основополагающих процессов, протекающих в тканях, за счет межклеточной сигнализации. По этой причине, внимание многих ученых обратилось к возможности исследования межклеточных взаимодействий, а также роли сигнального пути Notch в них при помощи сокультивирования разных типов клеток. Используют различные системы культивирования – с применением подложек, гелей, двойных камер. Наиболее распространенной моделью является сокультивирование эндотелиальных клеток с клетками мезенхимного происхождения. Способность эндотелиальных клеток оказывать эффект на интерстициальные клетки была показана в разных лабораториях, и активно изучается в настоящее время (Hjortnaes, Camci-Unal, et al., 2015; Hjortnaes, Shapero, et al., 2015; Lilly, Kennard, 2009). Связь между эндотелиальными и муральными клетками (гладкомышечные клетки, перициты и фибробласты) может определять размер и форму кровеносного сосуда во время ангиогенеза и контролировать функциональные аспекты зрелых кровеносных сосудов, определяя такие факторы, как сократительные свойства (Lill, Kennard, 2009).

По всему миру изучают механизмы кальцификации аортального клапана, накоплено определенное количество информации по данному вопросу. Тем не менее, до сих пор не существует единого мнения и понимания причин, по которым ткани клапана начинают подвергаться минерализации, при этом утрачивая свои изначальные функции. Таким образом, выявление факторов, запускающих кальцификацию и остеогенную трансформацию мезенхимных клеток в клапане, остается нерешенной и актуальной проблемой в настоящее время. Данное исследование направлено на изучение

потенциальных механизмов, лежащих в основе патологического состояния, связанного с кальцификацией тканей клапана аорты.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Клеточные культуры

Для исследования использовали клеточные культуры интерстициальных и эндотелиальных клеток аортального клапана человека. Фрагменты аортальных клапанов пациентов с кальцифицированным аортальным стенозом получали в ходе плановых операций по замене клапана аорты, осуществляемых в ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России. Образцы аортальных клапанов здоровых людей, погибших по причинам, не связанным с заболеваниями сердечно-сосудистой системы, получали в рамках программы мультиорганного забора для трансплантаций. Забор операционного материала проводился квалифицированным медицинским персоналом после подписания пациентами информированного согласия.

Для создания лентивирусных частиц были использованы клетки эмбриональной почки человека (НЕК293Т).

2.1.2. Штаммы бактерий

Для получения плазмидной ДНК в работе использовался бактериальный штамм Top10 E.Coli.

2.1.3. Плазмиды

Для создания лентивирусных частиц использовали плазмиды, несущие функциональные гены вируса иммунодефицита человека и гены, необходимые для его сборки: pLVTHM (несет ген интереса: *NICD*), psPAX2, pMD2.G (Malashicheva et al., 2007). Плазмиды были

сконструированы в лаборатории D. Trono (Ecole Pol Lausanne, Швейцария) и А. Н. Томилина (ИНЦ РАН).

2.1.4. Праймеры

Для анализа экспрессии генов в работе использовали праймеры, синтезированные в компании Синтол (Россия) и Applied Biosystems (США). Последовательности использованных праймеров приведены в таблице 1.

Название праймера	Последовательность (5'→3')
Праймеры для эндогенного контроля	
<i>GAPDH R</i>	F: AATGAAGGGGTCATTGATGG
	R: AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA
Праймеры к гену-мишени сигнального пути Notch	
<i>HEY1 F</i>	F: TGGATCACCTGAAAATGCTG
	R: CGAAATCCCAACTCCGATA
Праймеры к генам остеогенной дифференцировки	
<i>RUNX2</i>	F: TGGATCACCTGAAAATGCTG
	R: CGAAATCCCAACTCCGATA
<i>BMP4</i>	F: AGCACTGGTCTTGAGTATCCTG
	R: GCAGAGTTTTCACTGGTCCC
<i>COL1A1</i>	F: GACCTAAAGGTGCTGCTGGAG
	R: CTTGTTCACCTCTCTCGCCA

<i>OPG</i>	F: AAACGGCAACACAGCTCACAAGAA
	R: GCACGCTGTTTTACAGAGGTCAA
<i>BGLAP</i>	F: CCTCACACTCCTCGCCCTAT
	R: CTTGGACACAAAGGCTGCAC
<i>RANKL</i>	F: TCGTTGGATCACAGCACATCA
	R: TGAGCAAAAGGCTGAGCTTC
<i>IBSP</i>	F: GATTTCAGTTCAGGGCAGTAG
	R: CCATAGCCCAGTGTTGTAGC
<i>IHH</i>	F: AAGGAGCTCACCCCCAATTAC
	R: ATCACCGAGATAGCCAGCGA
<i>SFRP</i>	F: AATGCCACCGAAGCCTCCAA
	R: ATCCTCAGTGCAAACCTCGCT
<i>IL11</i>	F: ACAGCAGGCTACAAAACCACT
	R: ACCCACAATCCCACCTCTCT
<i>DLX2</i>	F: GGAGCCCCCATCCCTTATCTT
	R: ATCCGCAAAGGCACCTAAACT
<i>SOX5</i>	F: TGGGCTAAAGATGAACGGAGA
	R: GACGGGCTTGCTCCTCATAATA
<i>SOX6</i>	F: CACATGACCAGCGGACTCT
	R: GGAATGAACTGTACGGGGTAG
<i>SOX9</i>	F: AAGCTCTGGAGACTTCTGAACGA
	R: CTTGTAATCCGGGTGGTCCTT
	F: TCACCTGTGCCATACCAGTTAAA

<i>OPN</i>	R: TGGGTATTTGTTGTAAAGCTGCTT
<i>OGN</i>	F: GGCAATAACACCATTACCTCCC
	R: AGGGTGGTACAGCATCAATGT
<i>SPRY1</i>	F: GGACCCAGCCCAAGCAA
	R: TTGTGCTGTGTCAGGTCCTCTT
<i>BMP2</i>	F: GCCAGCCGAGCCAACAC
	R: CCCACTCGTTTCTGGTAGTTCTTC
<i>POSTN</i>	F: CCCAGCAGTTTTGCCCAT
	R: TGTGGTGGCTCCCACGAT
<i>ATF4 (TaqMan)</i>	HS00909569_g1
<i>SOST (TaqMan)</i>	HS00228830_m1

Таблица 1. Праймеры, использованные в ПЦР в реальном времени.

2.2. Методы

2.2.1. Трансформация бактерий

Для трансформации бактерий брали 50 мкл компетентных клеток, к которым добавляли 1 мкг плазмидной ДНК, инкубировали 1 час на льду. После чего клетки помещали в термостат на 20 секунд при 42°C для прохождения реакции теплового шока, затем снова охлаждали 2 минуты на льду. Далее добавляли 400 мкл бактериальной среды LB (трилона, 10 г/л; дрожжевого экстракта, 5г/л; NaCl, 10г/л; pH 6.8-7.2) без антибиотика, инкубировали 1 час при 37°C при перемешивании, затем клеточную суспензию высевали на твердую среду LB (1,5 % агар-агара), содержащую 1 мкг/л ампициллина для проведения селекции

трансформантов. Бактериальные клетки выращивали при 37°C в инкубаторе. На следующий день получали колонии бактерий, 1 колонию бактерий помещали в 2 мл жидкой среды LB с антибиотиком и выращивали 6-8 часов на качалке при 37°C, затем брали 500 мкл клеточной суспензии, добавляли 50% раствор стерильного глицерина в соотношении 1:1 и хранили при -80°C.

2.2.2. Выделение плазмидной ДНК

Для выделения ДНК клетки бактерий выращивали на чашке с твердой средой LB с добавлением антибиотика. Отдельную колонию помещали в 2 мл жидкой среды LB с антибиотиком и выращивали при 37°C на качалке в течение 6-8 часов. После этого клеточную суспензию переносили в 250 мл среды и выращивали при 37°C на качалке в течение ночи. Затем бактериальную культуру распределяли по пробиркам и центрифугировали 3200g 10 минут при 20°C для осаждения клеток. Супернатант удаляли, а клеточный осадок использовали для выделения плазмидной ДНК с помощью коммерческого набора HiPure Plasmid Purification Kit (Invitrogen, США) согласно рекомендациям производителя. Данный метод включает в себя этапы лизиса клеток, преципитации, осаждения ДНК на колонках и промывки ДНК с колонок при помощи буфера. После осаждения в спиртах ДНК сушили под вытяжкой, растворяли в 500 мкл TE и измеряли количество выделенной плазмидной ДНК при помощи спектрофотометра Nanodrop (Thermo scientific, США) в концентрации нг/мкл, так же оценивалась чистота образцов (соотношение пиков поглощения 260нм/280нм – примеси белков и аминокислот; 260нм/230нм – примеси солей и фенола). Хранили выделенную плазмидную ДНК при -40-80°C.

2.2.3. Производство лентивирусных частиц

В основе метода по производству лентивирусных частиц лежит протокол, разработанный в лаборатории Д. Троно и модифицированный в нашей лаборатории. Нарботка лентивирусных частиц осуществлялась в клетках линии НЕК293Т. Клетки данной линии культивировали в среде DMEM (Gibco, США) с добавлением 10% FBS (Gibco, США), 1%

пенициллин/стрептомицин (Invitrogen, США), 1% L-глутамин (Invitrogen, США) в инкубаторе с 5% CO₂ при 37°C.

Первый этап производства лентивирусных частиц заключался в использовании метода кальций-фосфатной трансфекции. За день до проведения трансфекции клетки сеяли из расчета 2,5 млн на 10 см культуральную чашку, чтобы на следующий день культура была на 70-80% конфлюэнтной.

Кальций-фосфатную трансфекцию осуществляли по схеме (расчет для одной 10 см культуральной чашки):

К 15 мкг векторной плазмиды, содержащей ген интереса, добавляли 9,73 мкг psPAX2 и 5,27 мкг pMD2.G, перемешивали и добавляли 440 мкл TE (0,1x) буфера, 75,3 мкл CaCl₂ (по каплям), и стерильной воды до конечного объема – 760 мкл.

Раствор, перемешивая, по каплям добавляли к 760 мкл 2xHBS (280 mM NaCl, 100 mM HEPES, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 7.1). Инкубировали смесь 10-15 минут при комнатной температуре (за это время должен образоваться преципитат ДНК/Ca²⁺), затем раствор по каплям добавляли к клеткам. Клетки инкубировали в течение 12 – 17 часов, после чего среду меняли на 7 мл свежей. Через сутки среду, содержащую вирусные частицы, собирали, центрифугировали 5 минут при 1200g, чтобы осадить попавшие клетки. Затем супернатант фильтровали через 0,45 мкм фильтр (Millipore, Германия) и центрифугировали в течение 2 часов при 72128g, 4°C, чтобы осадить вирусные частицы. Супернатант удаляли, осадок растворяли в 1% BSA/FBS; инкубировали на льду в течение часа, тщательно ресуспендировали вирус, затем замораживали и хранили при -80°C для дальнейшего использования в экспериментах.

Для оценки качества произведенных лентивирусных частиц и количества заражаемых ими клеток также совместно производили вирусные частицы, несущие *GFP*. Клетки линии НЕК293Т рассевали на 6-луночный планшет и трансдуцировали вирусом в различных концентрациях. Через 2-3 суток клетки снимали с культуральной чашки раствором 3% трипсина. С помощью проточного цитометра (CaliburII, Beckton Dickinson, США) оценивали процент зараженных клеток относительно внесенных концентраций вирусных частиц.

2.2.4. Выделение клеточных культур интерстициальных и эндотелиальных клеток аортального клапана человека

Фрагменты аортального клапана от пациентов с аортальным стенозом и здоровых доноров помещали в стерильную пробирку, содержащую фосфатно-солевой буфер (PBS) и антибиотики пенициллин/стрептомицин, и транспортировали в лабораторию. В стерильных условиях промывали створку PBS и инкубировали в растворе коллагеназы IV (1 мкг/мл) в среде для культивирования в водяной бане при температуре 37°C в течение 15 минут. Затем пробирку с клапаном интенсивно перемешивали при помощи специального аппарата в течение одной минуты, для открепления эндотелиальных клеток клапана. Клеточную суспензию центрифугировали в течение 5 минут при 300 g, отбирали жидкость над осадком, разводили клетки в свежей эндотелиальной среде, тщательно ресуспендировали, еще раз центрифугировали в течение 5 минут при 300 g, переносили клетки в чашку Петри, покрытую раствором 0,2% желатина, и культивировали в эндотелиальной среде.

Для получения интерстициальных клеток клапан оставляли в свежем растворе коллагеназы при температуре 37°C еще на 12-24 часов. После этого раствор с клапаном тщательно ресуспендировали, дважды промывали свежим раствором PBS. Затем интерстициальные клетки перемещали в чашку Петри. Клетки культивировали до появления характерных мезенхимных колоний. Затем клетки пересеивали и использовали для экспериментов.

2.2.5. Магнитный сортинг CD31-позитивных клеток

Эндотелиальные клетки культивировали до момента достижения ими 70-90% конфлюэнтности и затем осуществляли сортировку при помощи антител против эндотелиального маркера CD31. Принцип магнитной сепарации клеток основан на взаимодействии клеток со специфическими антителами, которые конъюгированы с магнитными микрочастицами. Суспензию меченых клеток помещают в магнитное поле, они задерживаются в колонке, а остальные клетки промываются. Таким образом, возможно получение определенного типа клеток с высоким процентом эффективности. Для разделения культуры эндотелиальных клеток и фибробластов использовали антитела против CD31, конъюгированные с магнитными частицами (Myltenyi Biotec, Германия). Брали культуру клеток, полученных после коллагеназного расщепления створки клапана, с

конфлюэнтностью 70-90%. Отбирали среду, промывали фосфатно-солевым буфером (PBS). Добавляли 1мл 3% трипсина, инкубировали в течение 5 минут. Затем добавляли среду для нейтрализации трипсина, ресуспендировали и переносили в пробирку. Центрифугировали в течение 5 минут при 300 g. Клеточный осадок ресуспендировали в 60 мкл среды. Для предотвращения неспецифического связывания добавляли 20 мкл блокирующего реагента (FcR Blocking Reagent) и аккуратно ресуспендировали. Затем добавляли 20 мкл магнитных микрочастиц, конъюгированных с CD31. Инкубировали в течение 15 минут при 4°C, затем добавляли 1 мл среды, тщательно ресуспендировали и центрифугировали клетки в течение 5 минут при 300 g. Среду над осадком убирали. Сам осадок разводили в 1 мл среды, после чего приступали к магнитной сепарации клеток. Для магнитного разделения использовали MS колонки (Miltenyi Biotec, Германия). Колонку помещали в паз магнита и промывали специальным буфером (Running Buffer) 3 раза по 500 мкл. Затем переносили клеточную суспензию в колонку и промывали колонку буфером 3 раза по 500 мкл. После чего переносили колонку в новую пробирку, добавляли 1 мл буфера и выдавливали клетки резким движением с помощью поршня. Далее откручивали клетки в течение 5 минут при 300 g, отбирали супернатант, разводили клетки в свежей эндотелиальной среде. Полученные культуры клеток использовали для последующих экспериментов и биобанкирования.

2.2.6. Культивирование интерстициальных и эндотелиальных клеток аортального клапана человека

Для культивирования первичных культур использовали одноразовые, стерильные пластиковые культуральные чашки и платы (Corning, США). Среда для культивирования интерстициальных клеток клапана содержала: DMEM (Gibco, США), 15% FBS (Gibco, США), 1% пенициллин/стрептомицин (Invitrogene, США) и 1% L-глутамин (Invitrogene, США). Для культивирования эндотелиальных клеток использовали среду ECM (ScienCell, США), содержащую все необходимые ростовые факторы. Культивирование клеток происходило в инкубаторе при 37°C с 5% CO₂. Питательную среду меняли каждые два – три дня. Пересев клеток производили по достижении клетками конфлюэнтности. Для пересева клетки промывали стерильным PBS, добавляли 3-5% раствор трипсина, инкубировали 5-10 минут, затем добавляли среду с сывороткой для ингибирования работы фермента, и снимали клетки с чашки, затем центрифугировали при 300g в течение 5 минут,

осадок ресуспендировали в свежей питательной среде. Количество клеток определяли с помощью камеры Горяева. Для этого использовали формулу: $N \cdot 10^4$, где N – среднее арифметическое число клеток в трех квадратах камеры, расположенных по диагонали/мл. Для экспериментов использовали первичные культуры интерстициальных и эндотелиальных клеток 1-6 пассажей. Плотность культивирования интерстициальных клеток аортального клапана в среднем составляла 16000 клеток/см². Средняя плотность культивирования эндотелиальных клеток клапана составляла 20000 клеток/см².

В ходе работы были получены клеточные культуры интерстициальных и эндотелиальных клеток клапана от пациентов со стенозированным клапаном аорты и от здоровых доноров (табл. 2).

Клеточные культуры	Количество (N)
ТАК	45
Здоровые доноры	18

Таблица 2. Клеточные культуры интерстициальных и эндотелиальных клеток клапана аорты.

Для криоконсервирования использовали клеточные культуры 1 – 2 пассажей. Для этого клетки промывали PBS, снимали с чашки 3-5% раствором трипсина, центрифугировали при 300g в течение 5 минут, определяли количество клеток. Оптимальная плотность клеток 10⁶ кл/мл. Клетки ресуспендировали в среде для заморозки: 50% сыворотки, 10% диметилсульфоксида (Sigma, США). Затем раствор с клетками переносили в специальные криовialsы и инкубировали 1 – 3 суток при -80°C в механическом замораживателе. После этого криовialsы переносили и хранили в жидком азоте.

Для размораживания пробирки с клетками переносили из жидкого азота в водяную баню и инкубировали при 50°C до размораживания клеточной суспензии. После этого клетки переносили в стерильную пробирку, добавляли культуральную среду по каплям для постепенного вымещения диметилсульфоксида, центрифугировали при 300g в течение 5 минут, супернатант удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в свежей питательной среде и переносили на культуральные чашки.

2.2.7. Сокультивирование интерстициальных клеток аортального клапана с эндотелиальными клетками

Для проведения экспериментов с сокультивированием клеточных культур в первый день эндотелиальные клетки аортального клапана высевали на культуральную чашку в плотности, оптимальной для проведения эксперимента, и, исходя из площади культуральной посуды. Через сутки на клеточный монослой насеивали интерстициальные клетки аортального клапана в необходимой плотности.

2.2.8. Трансдукция интерстициальных клеток аортального клапана лентивирусными частицами

Во время посева интерстициальных клеток на 6-луночные и 24-луночные планшеты в среду для культивации добавляли вирусные частицы. Эффективность трансдукции проверяли с помощью использования вируса, несущего GFP (собранный в той же продукции, что и используемые для эксперимента вирусы). Через 24 часа среду меняли на свежую.

2.2.9. Остеогенная дифференцировка интерстициальных клеток клапана аорты

Для дифференцировки в остеогенном направлении использовали клетки 2 – 5 пассажей, находящиеся в логарифмической фазе роста. За сутки до индукции дифференцировки клетки сеяли на 6-луночные, 12-луночные или 24-луночные планшеты в необходимой плотности (70×10^3 клеток/см²). Для запуска остеогенной дифференцировки клеток использовали следующие факторы: 0,1 мкМ дексаметазона, 50 мкМ аскорбиновой кислоты и 10 мМ β -глицеролфосфата (Sigma, США). Дифференцировка клеток проходила в течение 18 – 21 дня. Смену дифференцировочной среды проводили каждые 3 дня.

В качестве контроля в экспериментах использовали образцы, в которых не была запущена дифференцировка.

2.2.10. Окраска дифференцированных в остеогенном направлении интерстициальных клеток аортального клапана

На 18 – 21 день после запуска остеогенной дифференцировки клетки окрашивали красителем Ализариновым красным (Sigma, США), который специфически связывается с отложениями фосфата кальция.

Для окраски клеток удаляли среду и промывали клетки холодным PBS, затем фиксировали клетки холодным раствором 70-75% этанола и инкубировали в течение 30-60 минут при комнатной температуре. Затем промывали клетки 3 раза водой и добавляли краситель (150 мкл на лунку 24-луночного планшета), инкубировали клетки с красителем в течение 20 минут. После этого удаляли краситель и тщательно промывали лунки водой несколько раз. Окрашенные клетки фотографировали с помощью инвертированного микроскопа Axiovert (Zeiss, Германия) и совместимого фотоаппарата Canon. Расчет процентного соотношения дифференцированных клеток к недифференцированным проводился при помощи программы MosaiX (Carl Zeiss Microsystems, Германия).

2.2.11. Выделение РНК из клеточных культур

Выделение РНК из клеток проводили при помощи реагента для экстракции тотальной РНК (Евроген, Россия).

Из лунок отбирали среду для культивирования, клетки промывали холодным PBS, добавляли реагент для выделения РНК и, при помощи скребка, снимали клетки с чашки. Центрифугировали и добавляли к супернатанту хлороформ для разделения фаз (0,1 мл на 0,5 мл реагента), центрифугировали, отбирали водную фазу. Для осаждения РНК к водной фазе добавляли изопропиловый спирт (0,25 мл на 0,5 мл реагента). Инкубировали при -20-40°C в течение 12-24 часов, затем промывали осадок РНК в 75% растворе этанола (0,5 мл на 0,5 мл реагента). Спирт удаляли и осадок сушили в течение 30 минут. Затем осадок растворяли в 20 мкл стерильной воды, очищенной от нуклеаз. Количество выделенной РНК оценивали с помощью спектрофотометра Nanodrop (Thermo scientific, США) в концентрации нг/мкл, также оценивали чистоту образцов – соотношение пиков поглощения 260 нм/280 нм – соответствуют примесям белков и аминокислот; 260 нм/230 нм – примеси солей и фенола. Оценку качества выделенной РНК проводили при помощи метода

электрофореза в агарозном геле при силе тока 70 – 90 мА с использованием электрофоретических приборов (BioRad, США).

2.2.12. Обратная транскрипция

Реакция обратной транскрипции необходима для получения из РНК кДНК. Для этого использовали набор для обратной транскрипции (Евроген, Россия). Для осуществления одной реакции брали следующие компоненты: 1 или 2 мкг РНК (в зависимости от концентрации) разбавляли стерильной водой до 8 мкл, добавляли 1 мкл рандомных праймеров, 4 мкл 5х буфера (First Strand buffer), 2 мкл воды из набора, 2 мкл 10 мМ нуклеотидтрифосфатов, 2 мкл дитиотреитола (DTT) и 1 мкл M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) обратной транскриптазы.

2.2.13. ПЦР в реальном времени

Для количественного анализа изменения уровня экспрессии исследуемых генов использовали коммерческие системы ПЦР в реальном времени SYBR Green (Евроген, Россия). Из расчета на 1 реакцию использовали: 13 мкл воды SQ, по 1 мкл прямого и обратного праймеров, 5 мкл буфера с флуоресцентным красителем (qPCRmix-HS SYBR+ROX) и 5 мкл (разбавленной до 100 мкл водой) кДНК матрицы, полученной в результате реакции обратной транскрипции. В случае проведения ПЦР в реальном времени с использованием системы TaqMan, из расчета на 1 реакцию использовали: 14 мкл воды SQ, 1 мкл специфического зонда, 5 мкл буфера (qPCRmix-HS ROX) и 5 мкл (разбавленной до 100 мкл водой) кДНК матрицы, полученной в результате реакции обратной транскрипции. Реакцию проводили в 96-луночных оптических платах (Applied Biosystems, США).

Режим работы амплификатора: 5 мин 95°, затем 45 циклов, включающих денатурацию 15 сек при 95°C и отжиг праймеров с амплификацией 60 сек при 60°C. Температура отжига всех праймеров составляла около 60°C. Праймеры для ПЦР в реальном времени подбирали с использованием программы “Oligo 6” (Molecular Biology Insights, США).

Для анализа данных, полученных в ходе количественной ПЦР в режиме реального времени, в качестве метода представления относительной экспрессии гена использован

сравнительный Ct метод (2- $\Delta\Delta$ Ct метод), в модификации «относительное околичествление», при котором оценка экспрессии гена интереса производилась относительно экспрессии внутреннего контрольного гена. В ходе анализа для каждой реакции рассчитывали следующие показатели: значение Ct (Δ Ct), значение Δ Ct ($\Delta\Delta$ Ct) для репликаторов, показатель 2 $\Delta\Delta$ Ct, кратность отношения уровней экспрессии в образцах (в сравнении индивидуальных экспериментальных групп со средним значением для внутреннего контрольного образца). Уровень экспрессии исследуемого гена нормализовали по уровню экспрессии гена домашнего хозяйства *GAPDH*. Серии экспериментов повторяли трижды (биологические репликаты), для каждого эксперимента проверку уровня экспрессии соответствующего гена повторяли дважды (технические репликаты).

2.2.14. Статистическая обработка данных и построение графиков

Информация, полученная при помощи метода ПЦР в реальном времени, обрабатывалась с использованием программ Microsoft Excel и GraphPad Prism. Данные в результатах представлены в виде среднего по всем проведенным экспериментам, с указанием стандартных отклонений. Достоверность различий между группами оценивали при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия между группами при $P < 0,05$. На графиках достоверные различия отмечены звездочками.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Динамика экспрессии остеогенов при индукции остеогенной дифференцировки и активации сигнального пути Notch

Задача первого этапа работы состояла в том, чтобы выявить гены, экспрессирующиеся на начальных этапах остеогенной дифференцировки. Был сформирован список из 21 гена, экспрессия которых связана с остеогенной дифференцировкой, согласно данным литературы (табл. 3).

№	Ген	Ссылка
1	<i>RUNX2</i>	(Komori et al., 1997)
2	<i>BMP4</i>	(D. Chen et al., 1997)
3	<i>COL1A1</i>	(Jensen et al., 2010)
4	<i>OPG</i>	(Engin et al., 2008)
5	<i>BGLAP</i>	(Kreke et al., 2008)
6	<i>RANKL</i>	(Engin et al., 2008)
7	<i>IBSP</i>	(Suzuki A et al., 2009)
8	<i>IHH</i>	(Long et al., 2004)
9	<i>SFRP</i>	(Capulli et al., 2009)

10	<i>IL11</i>	(Matsumoto et al., 2012)
11	<i>DLX2</i>	(Suzuki A et al., 2009)
12	<i>SOX5</i>	(Akiyama, 2002)
13	<i>SOX6</i>	(Akiyama, 2002)
14	<i>SOX9</i>	(Akiyama, 2002)
15	<i>OPN</i>	(Ignatius et al., 2005)
16	<i>OGN</i>	(Verma et al., 2010)
17	<i>SPRY1</i>	(Kreke et al., 2008)
18	<i>BMP2</i>	(D. Chen et al., 1997)
19	<i>POSTN</i>	(Cobo et al., 2016)
20	<i>ATF4</i>	(Xiao et al., 2005)
21	<i>SOST</i>	(J. Guo et al., 2010)

Таблица 3. Список выбранных остеогенов, согласно проанализированной литературе

Мы проанализировали экспрессию каждого из указанных генов методом ПЦР в реальном времени через 24, 48, 72 и 96 часов после индукции остеогенной дифференцировки в интерстициальных клетках клапана (ИК) по сравнению с ИК, в которых дифференцировка не была запущена (рис. 7).

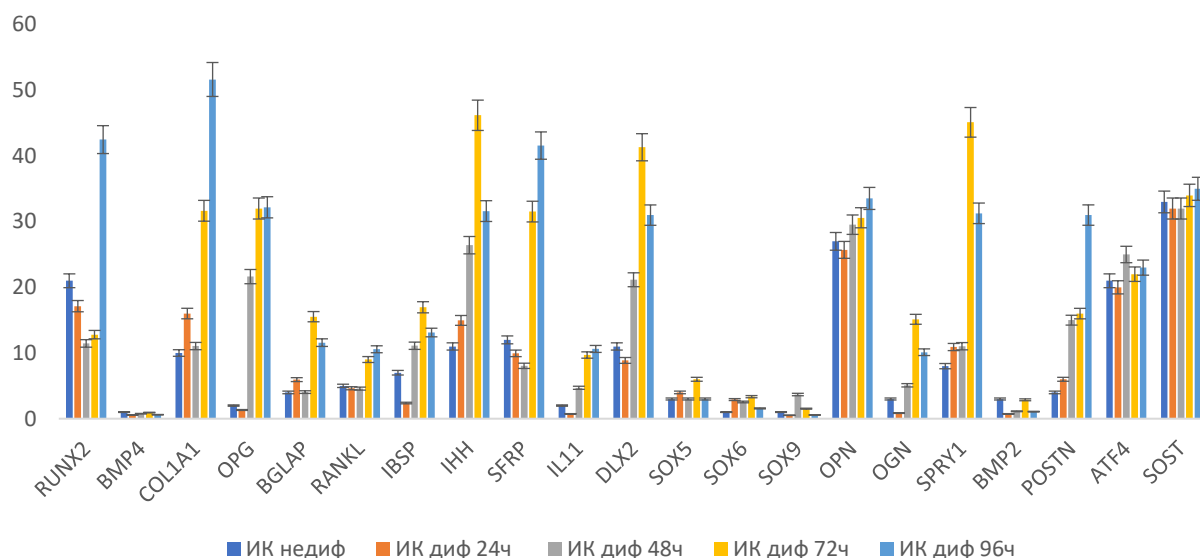


Рисунок 7. Сравнение экспрессии остеогенных генов на 24, 48, 72 и 96 часов после индукции остеогенной дифференцировки в интерстициальных клетках. По горизонтали – различные остеогены. По вертикали – относительный уровень экспрессии мРНК. Вертикальными отрезками обозначены величины стандартного отклонения.

Мы отметили значительное усиление экспрессии некоторых остеогенов: *RUNX2*, *COL1A1*, *OPG*, *IBSP*, *IHH*, *SFRP*, *DLX2*, *SPRY1*, *POSTN* по сравнению с контрольным образцом, в котором остеогенная дифференцировка не была запущена.

Следующий этап работы заключался в анализе экспрессии остеогенов при активации сигнального пути Notch при помощи лентивирусной трансдукции клеток частицами, несущими активированный внутриклеточный домен рецептора Notch1 – NICD.

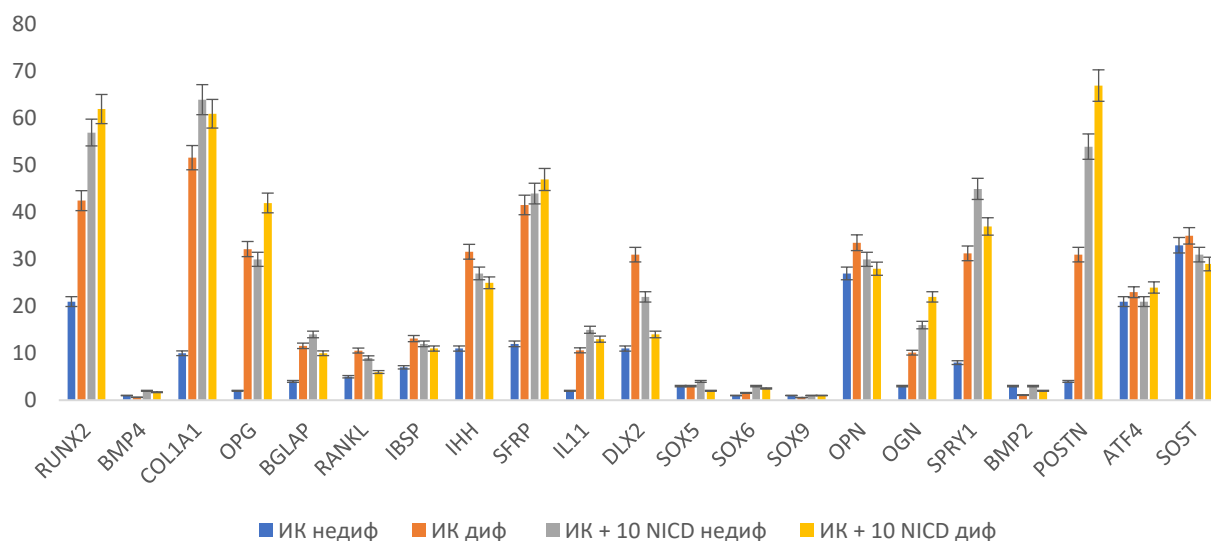


Рисунок 8. Сравнение экспрессии остеогенных генов после индукции остеогенной дифференцировки в интерстициальных клетках и при активации сигнального пути Notch. По горизонтали – различные остеогены. По вертикали – относительный уровень экспрессии мРНК. Вертикальными отрезками обозначены величины стандартного отклонения.

Активация сигнального пути Notch как сама по себе, так и в сочетании с индукцией остеогенной дифференцировки приводила к увеличению экспрессии некоторых остеогенов: *RUNX2*, *COL1A1*, *OPG*, *SPRY1*, *POSTN*.

Таким образом, проанализировав полученные данные, мы определили наиболее респонсивные в условиях выбранной нами временной точки остео маркеры, а также наиболее чувствительные к активации сигнального пути Notch: *RUNX2*, *COL1A1*, *OPG*, *POSTN*. Экспрессию этих остео-маркеров мы исследовали в последующих экспериментах.

3.2. Сокультивирование эндотелиальных и интерстициальных клеток клапана аорты усиливает остеогенную дифференцировку клеток и активирует Notch

В настоящее время накоплены данные о том, что взаимодействие клеток между собой играет значительную роль в определении клеточной судьбы и их спецификации (Lilly & Kennard, 2009). В связи с этим, следующей задачей работы было изучить влияние межклеточных взаимодействий между эндотелиальными и интерстициальными клетками на остеогенную дифференцировку.

Для этого мы индуцировали остеогенную дифференцировку в монокультуре интерстициальных клеток клапана и при сокультивировании ИК с эндотелиальными клетками клапана (рис. 9) и сравнили эффективность остеогенной дифференцировки при помощи окраски клеточных культур Ализариновым красным. Было отмечено существенное усиление интенсивности остеогенной дифференцировки в случае сокультивирования эндотелиальных и интерстициальных клеток клапана аорты.



Рисунок 9. Сравнение интенсивности остеогенной дифференцировки в монокультурах интерстициальных клеток клапана аорты (Б) и при сокультивировании эндотелиальных клеток с интерстициальными (А). Окраска Ализариновым красным на отложения фосфатов кальция. Фотографии сделаны на 18 день после запуска дифференцировки.

Затем, мы проверили, влияет ли плотность эндотелиальных клеток при сокультивировании их с интерстициальными клетками клапана аорты на интенсивность остеогенной дифференцировки. Чем большее количество эндотелиальных клеток было использовано при сокультивировании, тем более интенсивно проходила остеогенная дифференцировка клеток (рис. 10).

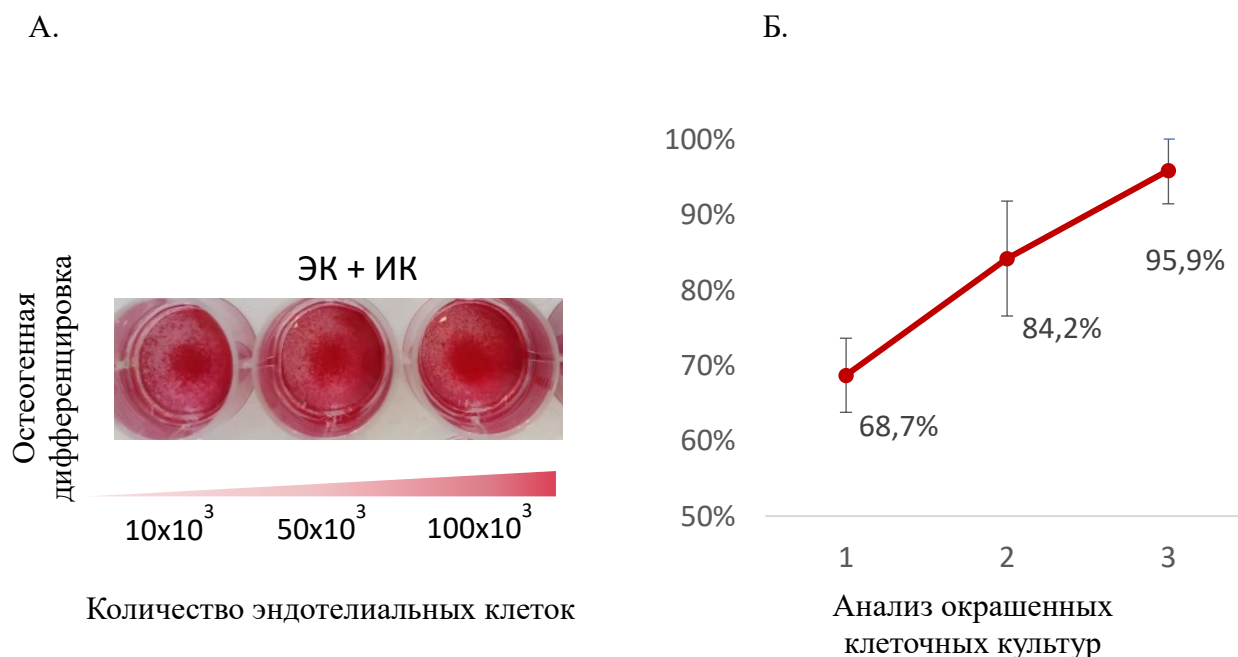


Рисунок 10. Влияние количества эндотелиальных клеток (10×10^3 , 50×10^3 , 100×10^3) при сокультивировании их с интерстициальными на степень остеогенной дифференцировки. Фотографии клеточных культур, окрашенных Ализариновым красным на 18 сутки после индукции остеогенной дифференцировки (А); результат анализа фотографий, вертикальными отрезками обозначены величины стандартного отклонения (Б).

При помощи метода ПЦР в реальном времени мы проанализировали изменение уровней экспрессии остео-маркеров *COL1A1*, *RUNX2*, *OPG* в ответ на увеличение дозы эндотелия в ко-культурах. Мы отметили тенденцию к увеличению экспрессии всех трех остеогенов по мере возрастания количества эндотелиальных клеток в культурах. Также мы проанализировали степень активации сигнального пути Notch. Экспрессия основного гена-мишени Notch – *HEY1* – дозо-зависимо усиливалась в ко-культурах ЭК и ИК. Таким образом, можно говорить о том, что межклеточные взаимодействия между эндотелиальными и интерстициальными клетками приводят к активации сигнального пути Notch.

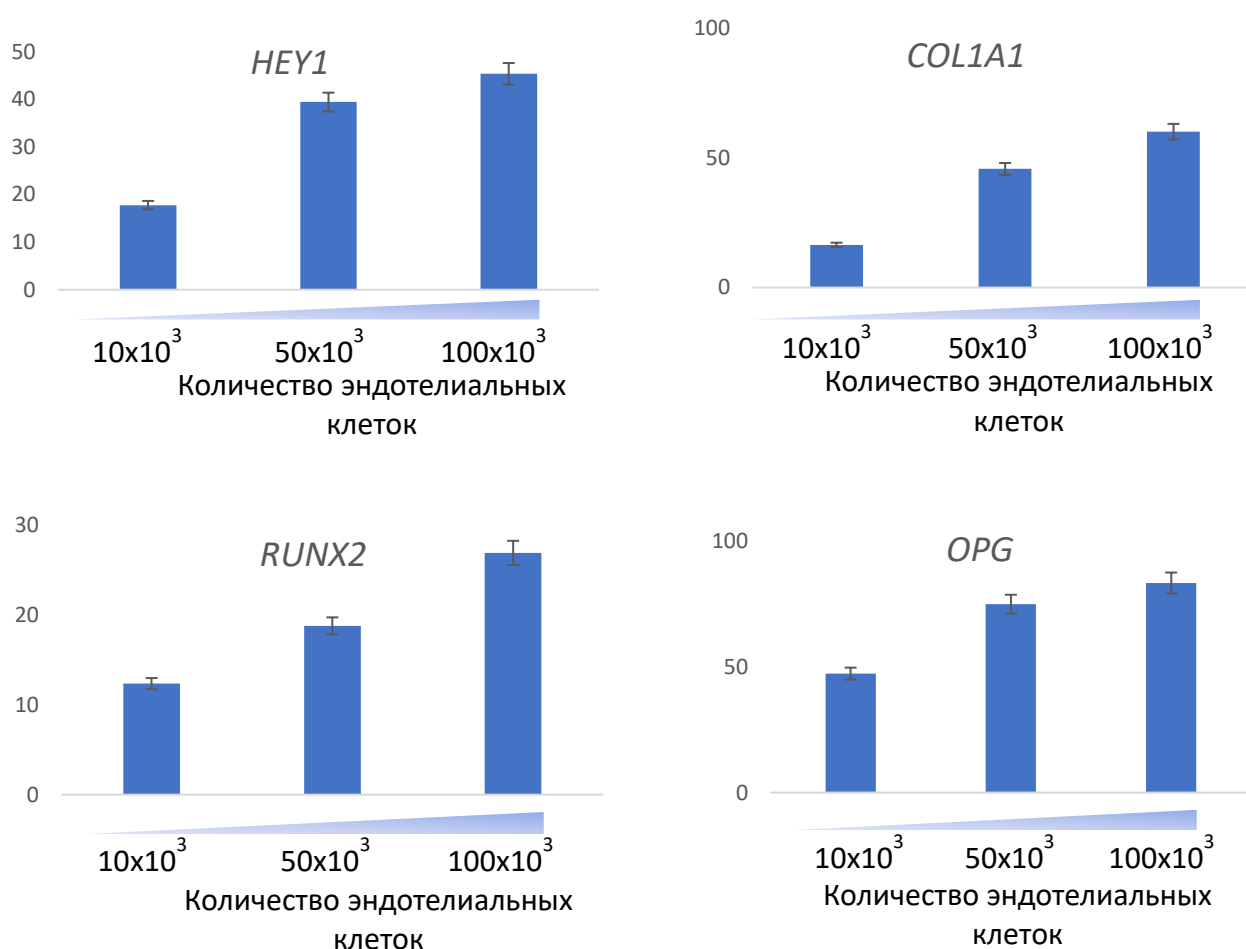


Рисунок 11. Увеличение дозы эндотелиальных клеток в ко-культуре (10×10^3 , 50×10^3 , 100×10^3) ведет к усилению экспрессии остео-маркеров *COL1A1*, *RUNX2*, *OPG*, а также к активации сигнального пути Notch (ген-мишень – *HEY1*). Данные получены при помощи ПЦР в реальном времени. По горизонтали – используемое количество эндотелиальных клеток при сокультивировании. По вертикали – относительный уровень экспрессии мРНК. Вертикальными отрезками обозначены величины стандартного отклонения.

3.3. Активация сигнального пути Notch ведет к дозозависимому усилению остеогенной дифференцировки клеток

Следующая задача состояла в оценке вклада активации сигнального пути Notch в усиление остеогенной дифференцировки ИК аортального клапана. Для этого мы активировали Notch путем трансдукции ИК лентивирусными частицами, несущими активированный внутриклеточный домен рецептора Notch1 – NICD. Индукцию дифференцировки проводили в присутствии и в отсутствии NICD.

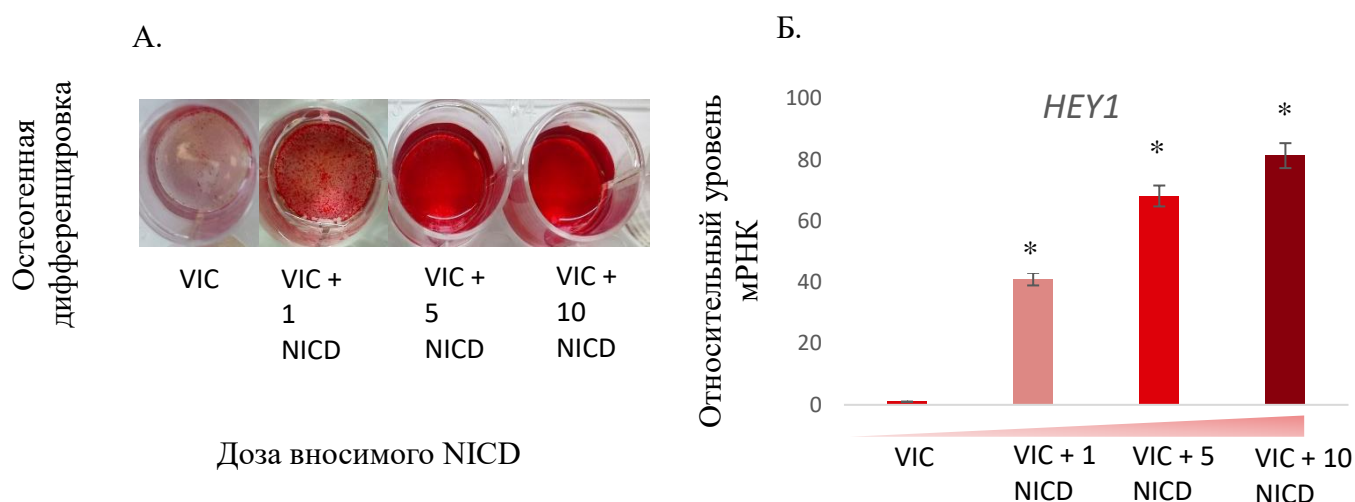


Рисунок 12. Активация сигнального пути Notch оказывает дозозависимый эффект на интенсивность остеогенной дифференцировки интерстициальных клеток аортального клапана. Фотографии клеточных культур, трансдуцированных лентивирусными частицами в различных концентрациях (1, 5, 10 мкл)* (А). Уровень экспрессии гена-мишени Notch – *HEY1*. Данные получены при помощи ПЦР в реальном времени. По горизонтали – различные концентрации лентивирусных частиц, несущих NICD. По вертикали –

относительный уровень экспрессии мРНК. Вертикальными отрезками обозначены величины стандартного отклонения. Звездочка – $P < 0,05$ (Б). *- 1 мкл концентрированного вируса содержит 10^5 инфекционных частиц (MOI).

Введение NICD приводило к дозозависимой активации транскрипции гена *HEY1*, мишени Notch1, активации экспрессии маркеров остеогенной дифференцировки *COL1A1*, *RUNX2*, *OPG*, а также к дозозависимому усилению интенсивности остеогенной дифференцировки. Таким образом, мы можем говорить о том, что активация сигнального пути Notch приводит к усилению остеогенной дифференцировки интерстициальных клеток аортального клапана.

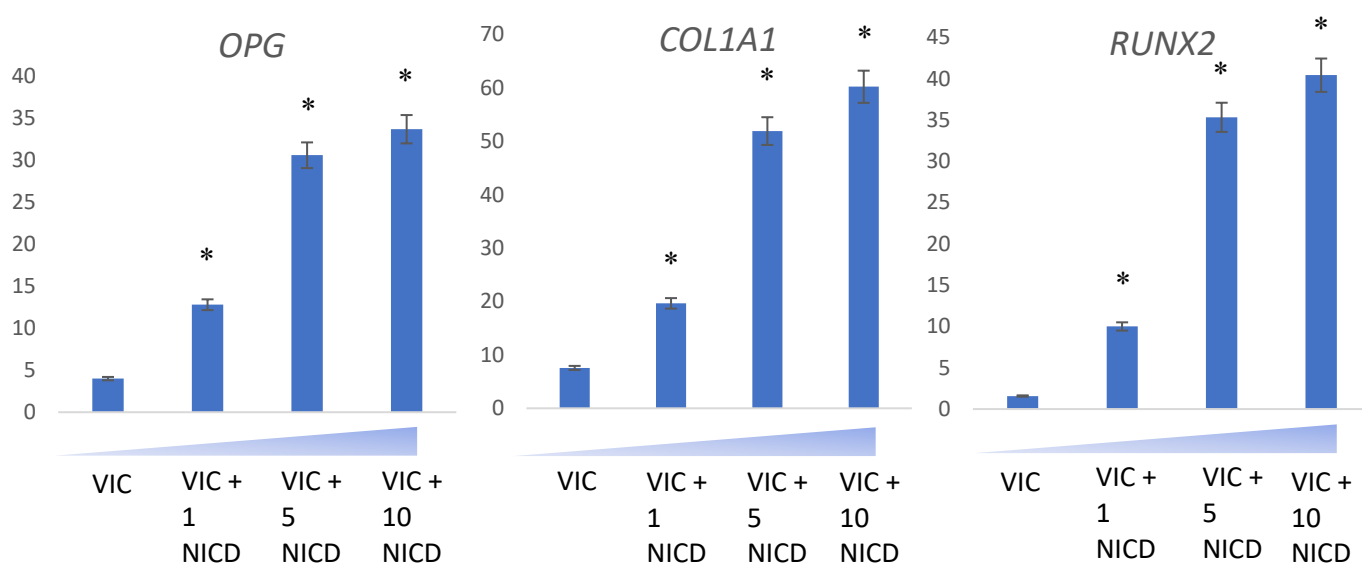


Рисунок 13. Дозозависимое повышение экспрессии остео-маркеров *COL1A1*, *RUNX2*, *OPG* в ответ на активацию сигнального пути Notch. Данные получены при помощи ПЦР в реальном времени. По горизонтали – различные концентрации лентивирусных частиц, несущих NICD (1, 5, 10 мкл)*. По вертикали – относительный уровень экспрессии мРНК. Вертикальными отрезками обозначены величины стандартного отклонения. Звездочка – $P < 0,05$. *- 1 мкл концентрированного вируса содержит 10^5 инфекционных частиц (MOI).

3.4. Различия между группами пациентов и здоровых людей по уровню активности сигнального пути Notch и про-остеогенным маркерам коллагену и периостину

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о значительном участии межклеточных взаимодействий между эндотелиальными и интерстициальными клетками клапана аорты в процессах кальцификации. Кроме того, мы отметили дозозависимую роль активации сигнального пути Notch в интенсивности остеогенной дифференцировки интерстициальных клеток клапана.

Следующий этап работы был посвящен выявлению различий между группами пациентов с кальцификацией аортального клапана и здоровых людей по уровню активации сигнального пути Notch и экспрессии про-остеогенных маркеров *COL1A1* и *POSTN*.

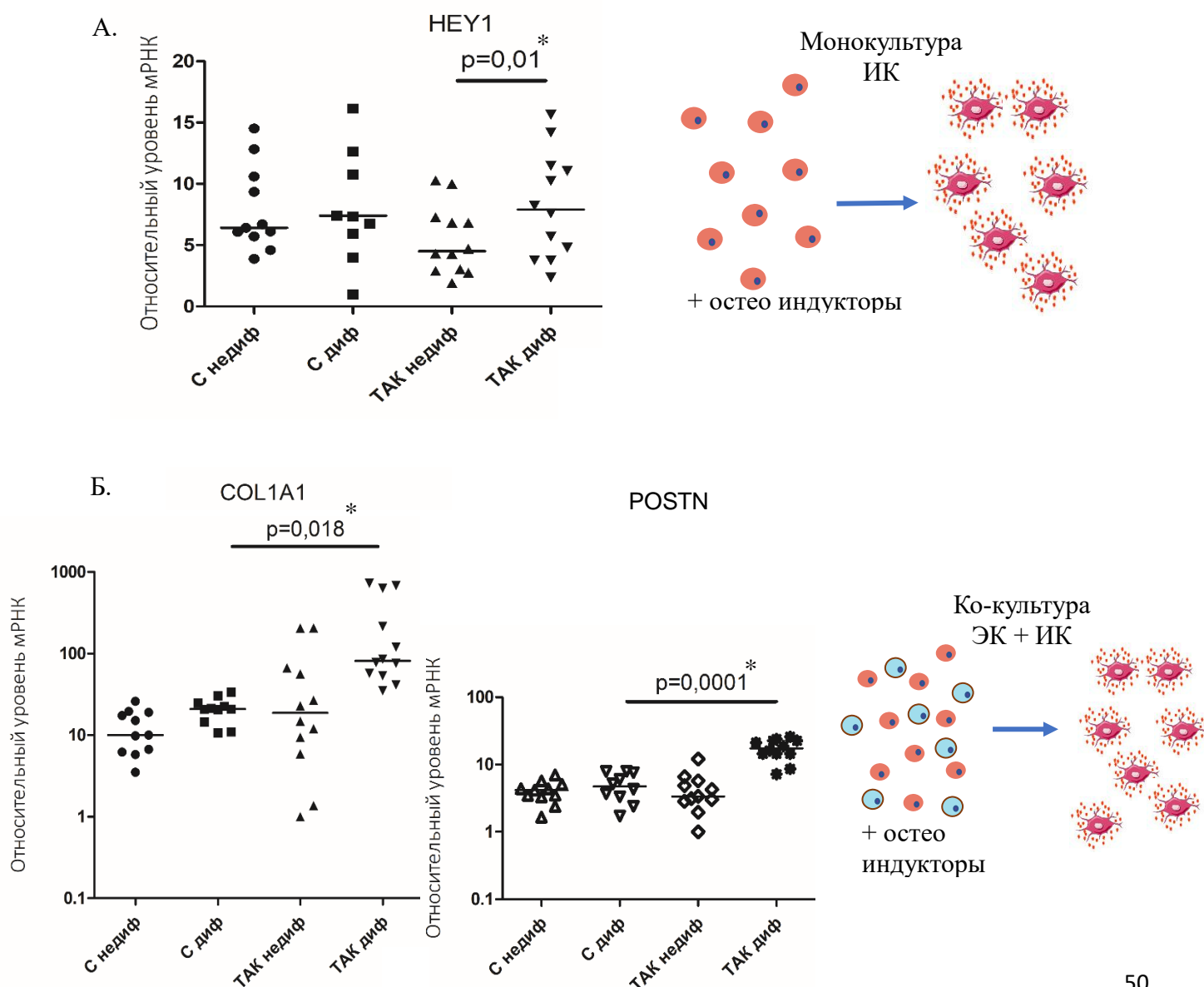


Рисунок 14. Экспрессия гена-мишени Notch – HEY1 (А); экспрессия про-остеогенов COL1A1, POSTN (Б). Данные получены при помощи ПЦР в реальном времени. Звездочка – $P < 0,05$.

Полученные нами данные говорят о том, что внесение остеогенных стимулов в культуры интерстициальных клеток клапана аорты вызывает активацию сигнального пути Notch только в монокультурах клеток, полученных от пациентов с кальцинированным стенозом. В тоже время, индукция остеогенной дифференцировки при сокультивировании эндотелиальных клеток с интерстициальными приводит к значительному усилению экспрессии про-остеогенов *COL1A1* и *POSTN* в клетках пациентов с кальцинированным стенозом в гораздо большей степени, чем в клетках здоровых клапанов.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

Стеноз аортального клапана, возникающий по причине кальцификации створок клапана, является наиболее распространенным заболеванием клапана в современном мире. Это третья ведущая причина всех сердечно-сосудистых заболеваний (Lung et al., 2003). Факторы риска включают наличие мужского пола, курение, диабет, гипертонию, высокий уровень циркулирующих липидов и метаболический синдром (O'Brien, 2007). Ранее считалось, что кальцификация является пассивным дегенеративным процессом, но теперь стало известно, что минерализация тканей клапана в большей степени – активный процесс, в котором принимают участие клетки, непосредственно входящие в состав створок аортального клапана (Goldbarg et al., 2007; Pomerance, 1967). Единственный существующий на сегодняшний день способ лечения – операция на сердце с помощью имплантации протеза клапана. Понимание клеточных и молекулярных процессов, связанных с кальцификацией клапана, может привести к возможности создания нехирургических вариантов лечения заболевания, что снизит риск осложнений и повысит качество жизни множества людей.

Результаты данного исследования демонстрируют значительное участие межклеточных взаимодействий между интерстициальными и эндотелиальными клетками клапана аорты в патологических процессах кальцификации тканей клапана. Опосредует и регулирует эти коммуникации в большой степени сигнальный путь Notch, обладающий широким спектром влияния на определение клеточной судьбы и спецификацию клеток в тканях организма (Gridley, 2010). Существует множество подтверждений глобальной роли межклеточных взаимодействий в поддержании гомеостаза тканей как развивающегося, так и взрослого организма (Hjortnaes et al., 2015; Lilly, Kennard, 2009). Коммуникации между разными типами клеток осуществляются при помощи множества сигнальных молекул, находящихся на поверхностях клеток. Различные сигналы, приходящие к клетке, запускают сложные каскадные пути, тесно взаимодействующие друг с другом. Такая тонкая настройка межклеточной коммуникации дает возможность клеткам «понимать» свою судьбу и место в организме. Нарушение какого-либо звена в этой сложной, разветвленной цепи приводит зачастую к тому, что клетки теряют способность поддерживать целостную, функциональную структуру, что приводит к различным патологическим процессам. Накапливается все больше данных, свидетельствующих о том, что в процессах кальцификации аортального клапана немалую роль играет нарушение межклеточных сообщений между интерстициальными и эндотелиальными клетками. По всему миру все

большее внимание уделяется изучению механизмов, опосредующих взаимодействия между разными типами клеток. Одной из перспективных моделей для исследования коммуникаций между клетками является система сокультивирования клеточных культур (Hjortnaes et al., 2015; Lilly, Kennard, 2009).

Известно, что клапаны сердца состоят из гетерогенной популяции эндотелиальных (ЭК) и интерстициальных клеток (ИК) клапана, которые поддерживают гомеостаз тканей клапана и целостность его структур. ИК – самый распространенный тип клеток в клапане сердца – играют ключевую роль в прогрессировании кальцификации клапана. В пораженных клапанах сердца различают пять фенотипов интерстициальных клеток, включая неподвижные фибробласто-подобные ИК, которые при первых признаках патологических процессов могут дифференцироваться в активированные миофибробласто-подобные ИК и остеобласто-подобные ИК, которые являются ответственными за активное отложение кальция в ткани (Aikawa et al., 2006; Hunt et al., 2002; Otto et al., 1994). Кроме того, многочисленные исследования продемонстрировали способность ИК претерпевать остеогенную дифференцировку (Osman et al., 2006; Peacock et al., 2010; Rajamannan et al., 2003)

Однако, относительно мало известно о роли ЭК в процессах кальцификации клапана. Эндотелиальные клетки покрывают поверхность клапана, образуя клеточный монослой. Они уникальны тем, что могут претерпевать эндотелиально-мезенхимный переход, являющийся критическим процессом в развитии клапана (Armstrong EJ et al., 2004; Madri JA et al., 1988; Paranya G et al., 2001; Wylie-Sears J et al., 2011). Во время развития эндотелиально-мезенхимный переход осуществляется в эндокардиальных подушках, где определенное количество эндотелиальных клеток отсоединяется от эндотелия, временно усиливает экспрессию сократительного белка α -SMA и мигрирует в интерстициум эмбрионального клапана, чтобы стать интерстициальными клетками (Armstrong EJ et al., 2004; Combs MD et al., 2009; Person AD et al., 2005). Эндотелиально-мезенхимный переход также встречается во взрослых клапанах, где клетки, совместно экспрессирующие эндотелиальные маркеры и α -SMA, располагаются вдоль эндотелия клапана и в субэндотелиальных положениях (Frid MG et al., 2002). Эти наблюдения породили гипотезу о том, что низкий или базальный уровни эндотелиально-мезенхимного перехода способствуют пополнению ИК в рамках физиологического ремоделирования клапана, которое требуется в течение постнатальной жизни (Paruchuri S et al., 2006). Кроме того, было показано, что эндотелиальные клетки клапана способны дифференцироваться *in vitro* в мезенхимные клетки, в том числе в остеогенные клетки (Wylie-Sears J et al., 2011).

Было показано, что ЭК являются ключевыми регуляторами на ранних этапах развития кальцификации клапана, рекрутируя иммунные клетки (Skowasch D et al., 2005). Кроме того, происходит нарушение защитного сигнального каскада оксида азота (NO), (Bosse K et al., 2013; Richards Jet al., 2013) и фенотипической пластичности за счет экспрессии про-кальцифицирующих белков (Wylie-Sears J et al., 2011). В совокупности эти исследования указывают на потенциальную роль дисрегуляции функционирования эндотелиальных клеток в кальцификации аортального клапана (Hjortnaes et al., 2015)

Описанные данные согласуются с полученными нами результатами, свидетельствующими о том, что сокультивирование эндотелиальных и интерстициальных клеток аортального клапана приводит к усилению интенсивности прохождения остеогенной дифференцировки в клеточных ко-культурах по сравнению с монокультурами ИК.

Было показано, что сокультивирование эндотелиальных клеток и фибробластов приводит к резким изменениям в экспрессии генов, которые, вероятно, способствуют правильному формированию и функционированию кровеносных сосудов. Кроме того, сигнальный путь Notch является критическим участником в сообщениях между эндотелиальными клетками и фибробластами. Показана необходимость этого пути для экспрессии некоторых генов, индуцируемых эндотелием (Lilly, Kennard, 2009).

Данные литературы согласуются с полученными нами результатами о важности передачи сигналов Notch во взаимодействии двух типов клеток в процессах ангиогенеза и вальвулогенеза. Было продемонстрировано, что в условиях сокультивирования эндотелиальных клеток и фибробластов сигнализация Notch является односторонней, при этом эндотелиальные клетки посылают сигнал, получаемый фибробластами (Lilly, Kennard, 2009).

Кроме того, в нашей лаборатории ранее была проведена работа, посвященная изучению роли сигнального пути Notch в остеогенной дифференцировке мезенхимных стволовых клеток (МСК). В ней было показано, что активация Notch приводила к дозозависимому усилению эффективности остеогенной дифференцировки клеток. Таким образом, мы видим значительное участие сигнального пути Notch в коммуникациях между клетками и влияние, оказываемое данными механизмами, приводит к изменению паттернов экспрессии некоторых про-остеогенных генов, активируя тем самым остеогенную дифференцировку также в клетках аортального клапана.

Ранее было показано, что профили экспрессии генов-компонентов сигнального пути Notch, а также некоторых про-остеогенных генов в интерстициальных клетках пациентов с кальцифицированным аортальным стенозом и здоровых людей отличаются (Kostina 2018).

Представленное исследование также показало, что клетки, полученные от пациентов с кальцификацией аортального клапана, обладают некой генетической предрасположенностью к большей чувствительности к остеогенным стимулам. И значительная роль в остео трансформации интерстициальных клеток принадлежит межклеточным взаимодействиям между эндотелиальными и интерстициальными клетками. Эти сообщения между клетками опосредуются во-многом сигнальным путем Notch.

Данное исследование вносит вклад в массив существующей информации о причинах и механизмах, индуцирующих события, которые осуществляются на ранних этапах кальцификации аортального клапана. Понимание процессов, лежащих в основе межклеточных взаимодействий между эндотелиальными и интерстициальными клетками клапана, имеет несомненную актуальность не только с точки зрения научного интереса, но также и в прикладном аспекте.

ВЫВОДЫ

- Сокультивирование интерстициальных клеток клапана аорты с эндотелиальными значительно усиливает степень остеогенной дифференцировки
- Активация сигнального пути Notch приводит к дозозависимому усилению остеогенной дифференцировки интерстициальных клеток аортального клапана
- Обнаружены различия между группами пациентов и здоровых людей по уровню активности сигнального пути Notch и остеогенным маркерам коллагену и периостину

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кэм. А. Джон. 2011.* Болезни сердца и сосудов: Руководство Европейского общества кардиологов. Под ред. Е.В.Шляхто. М.: ГЭОТАР-Медиа., 780-790.
- Новиков В.Н., Новикова В.Н. 2015.* Клапанные Пороки Сердца. СПб.: СпецЛит., 7-26.
- Орловский П.И., Гриценко В.В., Юхнев А.Д., Евдокимов С.В., Гавриленков В.И. 2007.* Искусственные клапаны сердца. Под ред. Ю.Л.Шевченко. СПб.: ЗАО “ОЛМА Медиа Групп”, 9-21.
- Abu-Issa, R., Kirby, M. L. 2007.* Heart field: from mesoderm to heart tube. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23(1), 45–68.
- Acharya, A., Hans, C. P., Koenig, S. N., Nichols, H. A., Galindo, C. L., Garner, H. R., ... Garg, V. 2011.* Inhibitory role of Notch1 in calcific aortic valve disease. *PloS One*, 6(11), e27743.
- Aikawa, E., Whittaker, P., Farber, M., Mendelson, K., Padera, R. F., Aikawa, M., Schoen, F. J. 2006.* Human semilunar cardiac valve remodeling by activated cells from fetus to adult: implications for postnatal adaptation, pathology, and tissue engineering. *Circulation*, 113(10), 1344–52.
- Akiyama, H. 2002.* The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes & Development*, 16(21), 2813–2828.
- Andelfinger, G., Tapper, A. R., Welch, R. C., Vanoye, C. G., George, A. L., Benson, D. W. 2002.* KCNJ2 mutation results in Andersen syndrome with sex-specific cardiac and skeletal muscle phenotypes. *American Journal of Human Genetics*, 71(3), 663–8.
- Andersson, E. R., Sandberg, R., Lendahl, U. 2011.* Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development (Cambridge, England)*, 138(17), 3593–612.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., Lake, R. J. 1999.* Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5415), 770–6.
- Bostrom, K. I., Rajamannan, N. M., Towler, D. A. 2011.* The Regulation of Valvular and Vascular Sclerosis by Osteogenic Morphogens. *Circulation Research*, 109(5), 564–577.
- Boström, K. I., Rajamannan, N. M., Towler, D. A. 2011.* The regulation of valvular and vascular sclerosis by osteogenic morphogens. *Circulation Research*, 109(5), 564–77.

- Boström, K., Watson, K. E., Horn, S., Wortham, C., Herman, I. M., Demer, L. L. 1993. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *Journal of Clinical Investigation*, 91(4), 1800–1809.
- Braverman, A. C., Güven, H., Beardslee, M. A., Mekan, M., Kates, A. M., Moon, M. R. 2005. The bicuspid aortic valve. *Current Problems in Cardiology*, 30(9), 470–522.
- Briot, A., Bouloumié, A., Iruela-Arispe, M. L. 2016. Notch, lipids, and endothelial cells. *Current Opinion in Lipidology*, 27(5), 513–20.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J. R., ... Israël, A. 2000. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Molecular Cell*, 5(2), 207–16.
- Brownstein, A. J., Ziganshin, B. A., Kuivaniemi, H., Body, S. C., Bale, A. E., Elefteriades, J. A. 2017. Genes Associated with Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection: An Update and Clinical Implications. *Aorta (Stamford, Conn.)*, 5(1), 11–20.
- Butcher, J. T., Mahler, G. J., Hockaday, L. A. 2011. Aortic valve disease and treatment: the need for naturally engineered solutions. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(4–5), 242–68.
- Butcher, J. T., Nerem, R. M. 2007. Valvular endothelial cells and the mechanoregulation of valvular pathology. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 362(1484), 1445–57.
- Byon, C. H., Sun, Y., Chen, J., Yuan, K., Mao, X., Heath, J. M., ... Chen, Y. 2011. Runx2-upregulated receptor activator of nuclear factor κ B ligand in calcifying smooth muscle cells promotes migration and osteoclastic differentiation of macrophages. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(6), 1387–96.
- Caira, F. C., Stock, S. R., Gleason, T. G., McGee, E. C., Huang, J., Bonow, R. O., ... Rajamannan, N. M. 2006. Human degenerative valve disease is associated with up-regulation of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 receptor-mediated bone formation. *Journal of the American College of Cardiology*, 47(8), 1707–12.
- Canfield, A. E., Sutton, A. B., Hoyland, J. A., Schor, A. M. 1996. Association of thrombospondin-1 with osteogenic differentiation of retinal pericytes in vitro. *Journal of Cell Science*, 109 (Pt 2), 343–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8838658>
- Capulli, M., Rufo, A., Teti, A., Rucci, N. 2009. Global transcriptome analysis in mouse calvarial

- osteoblasts highlights sets of genes regulated by modeled microgravity and identifies a “mechanoresponsive osteoblast gene signature.” *Journal of Cellular Biochemistry*, 107(2), 240–252.
- Chakraborty, S., Combs, M. D., Yutzey, K. E. 2010.* Transcriptional regulation of heart valve progenitor cells. *Pediatric Cardiology*, 31(3), 414–21.
- Chang, K., Weiss, D., Suo, J., Vega, J. D., Giddens, D., Taylor, W. R., Jo, H. 2007.* Bone morphogenic protein antagonists are coexpressed with bone morphogenic protein 4 in endothelial cells exposed to unstable flow in vitro in mouse aortas and in human coronary arteries: role of bone morphogenic protein antagonists in inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 116(11), 1258–66.
- Chen, D., Harris, M. A., Rossini, G., Dunstan, C. R., Dallas, S. L., Feng, J. Q., ... Harris, S. E. 1997.* Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, BMP-4, and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *Calcified Tissue International*, 60(3), 283–90.
- Chen, J., Ryzhova, L. M., Sewell-Loftin, M. K., Brown, C. B., Huppert, S. S., Baldwin, H. S., Merryman, W. D. 2015.* Notch1 Mutation Leads to Valvular Calcification Through Enhanced Myofibroblast MechanotransductionSignificance. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(7), 1597–1605.
- Cheng, S.-L., Shao, J.-S., Behrmann, A., Krchma, K., Towler, D. A. 2013.* Dkk1 and MSX2-Wnt7b signaling reciprocally regulate the endothelial-mesenchymal transition in aortic endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(7), 1679–89.
- Cobo, T., Vilorio, C. G., Solares, L., Fontanil, T., González-Chamorro, E., De Carlos, F., ... Obaya, A. J. 2016.* Role of Periostin in Adhesion and Migration of Bone Remodeling Cells. *Plos One*, 11(1), e0147837.
- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., ... Kopan, R. 1999.* A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*, 398(6727), 518–22.
- Demer, L. L., Tintut, Y. 2008.* Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation*, 117(22), 2938–48.

- Demer, L. L., Tintut, Y. 2014.* Inflammatory, metabolic, and genetic mechanisms of vascular calcification. PubMed Commons. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 34(4), 715–723.
- Dietz, H. C., Pyeritz, R. E. 1995.* Mutations in the human gene for fibrillin-1 (FBN1) in the Marfan syndrome and related disorders. *Human Molecular Genetics*, 4 Spec No, 1799–809.
- Egan, K. P., Kim, J.-H., Mohler, E. R., Pignolo, R. J. 2011.* Role for circulating osteogenic precursor cells in aortic valvular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(12), 2965–71.
- Engin, F., Yao, Z., Yang, T., Zhou, G., Bertin, T., Jiang, M. M., ... Lee, B. 2008.* Dimorphic effects of Notch signaling in bone homeostasis. *Nature Medicine*, 14(3), 299–305.
- Fedak, P. W. M., de Sa, M. P. L., Verma, S., Nili, N., Kazemian, P., Butany, J., ... David, T. E. 2003.* Vascular matrix remodeling in patients with bicuspid aortic valve malformations: implications for aortic dilatation. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 126(3), 797–806.
- Friedman, T., Mani, A., Elefteriades, J. A. 2008.* Bicuspid aortic valve: clinical approach and scientific review of a common clinical entity. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 6(2), 235–48.
- Fuery, M. A., Liang, L., Kaplan, F. S., Mohler, E. R. 2017.* Vascular ossification: Pathology, mechanisms, and clinical implications. *Bone*, (2016).
- Garg, V. 2006.* Insights into the genetic basis of congenital heart disease. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 63(10), 1141–8.
- Garg, V., Muth, A. N., Ransom, J. F., Schluterman, M. K., Barnes, R., King, I. N., ... Srivastava, D. 2005.* Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature*, 437(7056), 270–4.
- Girdauskas, E., Geist, L., Disha, K., Kazakbaev, I., Groß, T., Schulz, S., ... Kurth, I. 2017.* Genetic abnormalities in bicuspid aortic valve root phenotype: preliminary results. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery : Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery*, 52(1), 156–162.
- Girdauskas, E., Schulz, S., Borger, M. A., Mierzwa, M., Kuntze, T. 2011.* Transforming growth factor-beta receptor type II mutation in a patient with bicuspid aortic valve disease and intraoperative aortic dissection. *The Annals of Thoracic Surgery*, 91(5), e70-1.

- Giusti, B., Sticchi, E., De Cario, R., Magi, A., Nistri, S., Pepe, G. 2017. Genetic bases of bicuspid aortic valve: The contribution of traditional and high-throughput sequencing approaches on research and diagnosis. *Frontiers in Physiology*, 8(AUG), 1–12.
- Goldberg, S. H., Elmariah, S., Miller, M. A., Fuster, V. 2007. Insights Into Degenerative Aortic Valve Disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 50(13), 1205–1213.
- Grego-Bessa, J., Luna-Zurita, L., del Monte, G., Bolós, V., Melgar, P., Arandilla, A., ... de la Pompa, J. L. 2007. Notch signaling is essential for ventricular chamber development. *Developmental Cell*, 12(3), 415–29.
- Gridley, T. 2010. Notch Signaling in the Vasculature (pp. 277–309).
- Guerraty, M., Mohler, E. R. 2007. Models of Aortic Valve Calcification. *Journal of Investigative Medicine*, 55(6), 278–283.
- Guo, D.-C., Grove, M. L., Prakash, S. K., Eriksson, P., Hostetler, E. M., LeMaire, S. A., ... Milewicz, D. M. 2016. Genetic Variants in LRP1 and ULK4 Are Associated with Acute Aortic Dissections. *American Journal of Human Genetics*, 99(3), 762–769.
- Guo, D.-C., Pannu, H., Tran-Fadulu, V., Papke, C. L., Yu, R. K., Avidan, N., ... Milewicz, D. M. 2007. Mutations in smooth muscle α -actin (ACTA2) lead to thoracic aortic aneurysms and dissections. *Nature Genetics*, 39(12), 1488–1493.
- Guo, J., Liu, M., Yang, D., Boussein, M. L., Saito, H., Galvin, R. J. S., ... Kronenberg, H. M. 2010. Suppression of Wnt Signaling by Dkk1 Attenuates PTH-Mediated Stromal Cell Response and New Bone Formation. *Cell Metabolism*, 11(2), 161–171.
- Hjortnaes, J., Camci-Unal, G., Hutcheson, J. D., Jung, S. M., Schoen, F. J., Kluin, J., ... Khademhosseini, A. 2015. Directing valvular interstitial cell myofibroblast-like differentiation in a hybrid hydrogel platform. *Advanced Healthcare Materials*, 4(1), 121–30.
- Hjortnaes, J., Shapero, K., Goettsch, C., Hutcheson, J. D., Keegan, J., Kluin, J., ... Aikawa, E. 2015. Valvular interstitial cells suppress calcification of valvular endothelial cells. *Atherosclerosis*, 242(1), 251–260.
- Hruska, K. A., Mathew, S., Saab, G. 2005. Bone Morphogenetic Proteins in Vascular Calcification. *Circulation Research*, 97(2), 105–114.
- Hunt, J. L., Fairman, R., Mitchell, M. E., Carpenter, J. P., Golden, M., Khalapyan, T., ... Mohler,

- E. R. 2002.* Bone formation in carotid plaques: a clinicopathological study. *Stroke*, 33(5), 1214–9.
- Hutcheson, J. D., Chen, J., Sewell-Loftin, M. K., Ryzhova, L. M., Fisher, C. I., Su, Y. R., Merryman, W. D. 2013.* Cadherin-11 regulates cell-cell tension necessary for calcific nodule formation by valvular myofibroblasts. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(1), 114–20.
- Ignatieva, E., Kostina, D., Irtyuga, O., Uspensky, V., Golovkin, A., Gavriluk, N., ... Malashicheva, A. 2017.* Mechanisms of Smooth Muscle Cell Differentiation Are Distinctly Altered in Thoracic Aortic Aneurysms Associated with Bicuspid or Tricuspid Aortic Valves. *Frontiers in Physiology*, 8.
- Ignatius, A., Blessing, H., Liedert, A., Schmidt, C., Neidlingerwilke, C., Kaspar, D., ... Claes, L. 2005.* Tissue engineering of bone: effects of mechanical strain on osteoblastic cells in type I collagen matrices. *Biomaterials*, 26(3), 311–318.
- Irtyuga, O., Malashicheva, A., Zhiduleva, E., Freylikhman, O., Rotar, O., Bäck, M., ... Moiseeva, O. 2017.* NOTCH1 Mutations in Aortic Stenosis: Association with Osteoprotegerin/RANK/RANKL. *BioMed Research International*, 2017, 1–10.
- Iso, T., Kedes, L., Hamamori, Y. 2003.* HES and HERP families: Multiple effectors of the notch signaling pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 194(3), 237–255.
- Itoh, M., Kim, C.-H., Palardy, G., Oda, T., Jiang, Y.-J., Maust, D., ... Chitnis, A. B. 2003.* Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Developmental Cell*, 4(1), 67–82.
- Iung, Blung B, Baron G, Butchart EG, Delahaye F, Gohlke-Bärwolf C, Levang OW, Tornos P, Vanoverschelde JL, Vermeer F, Boersma E, Ravaud P, V. A. 2003.* A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. - PubMed - NCBI.
- Jahnen-Dechent, W., Heiss, A., Schäfer, C., Ketteler, M. 2011.* Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism. *Circulation Research*, 108(12), 1494–509.
- Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E. H., Kopan, R., Israel, A. 1995.* Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature*, 377(6547), 355–8.
- Jensen, E. D., Gopalakrishnan, R., Westendorf, J. J. 2010.* Regulation of gene expression in

- osteoblasts. *BioFactors*, 36(1), NA-NA.
- Jeziorska, M., McCollum, C., Wooley, D. E. 1998.* Observations on bone formation and remodelling in advanced atherosclerotic lesions of human carotid arteries. *Virchows Archiv : An International Journal of Pathology*, 433(6), 559–65.
- Johnson, R. C., Leopold, J. A., Loscalzo, J. 2006.* Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circulation Research*, 99(10), 1044–59.
- Kaden, J. J., Reinöhl, J. O., Blesch, B., Brueckmann, M., Haghi, D., Borggrefe, M., ... Ortlepp, J. R. 2007.* Systemic and local levels of fetuin-A in calcific aortic valve stenosis. *International Journal of Molecular Medicine*, 20(2), 193–7.
- Kelly, D. F., Lake, R. J., Middelkoop, T. C., Fan, H.-Y., Artavanis-Tsakonas, S., Walz, T. 2010.* Molecular structure and dimeric organization of the Notch extracellular domain as revealed by electron microscopy. *PloS One*, 5(5), e10532.
- Kodo, K., Nishizawa, T., Furutani, M., Arai, S., Yamamura, E., Joo, K., ... Yamagishi, H. 2009.* GATA6 mutations cause human cardiac outflow tract defects by disrupting semaphorin-plexin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(33), 13933–8.
- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., ... Kishimoto, T. 1997.* Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 89(5), 755–64.
- Koos, R., Krueger, T., Westenfeld, R., Kühl, H. P., Brandenburg, V., Mahnken, A. H., ... Schurgers, L. J. 2009.* Relation of circulating Matrix Gla-Protein and anticoagulation status in patients with aortic valve calcification. *Thrombosis and Haemostasis*, 101(4), 706–13.
- Kopan, R. 2002.* Notch: a membrane-bound transcription factor. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 6), 1095–7.
- Kopan, R., Ilagan, M. X. G. 2009.* The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*, 137(2), 216–33.
- Kostina, A. S., Uspensky, V. E., Irtyuga, O. B., Ignatieva, E. V., Freylikhman, O., Gavriliuk, N. D., ... Malashicheva, A. B. 2016.* Notch-dependent EMT is attenuated in patients with aortic aneurysm and bicuspid aortic valve. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1862(4), 733–740.

- Kostina, A., Shishkova, A., Ignatieva, E., Irtyuga, O., Bogdanova, M., Levchuk, K., ... Malashicheva, A. 2018.* Different Notch signaling in cells from calcified bicuspid and tricuspid aortic valves. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 114, 211–219.
- Kovacic, J. C., Mercader, N., Torres, M., Boehm, M., Fuster, V. 2012.* Epithelial-to-mesenchymal and endothelial-to-mesenchymal transition: from cardiovascular development to disease. *Circulation*, 125(14), 1795–808.
- Krebs, L. T., Defetos, M. L., Bevan, M. J., Gridley, T. 2001.* The Nrarp gene encodes an ankyrin-repeat protein that is transcriptionally regulated by the notch signaling pathway. *Developmental Biology*, 238(1), 110–9.
- Krebs, L. T., Xue, Y., Norton, C. R., Shutter, J. R., Maguire, M., Sundberg, J. P., ... Gridley, T. 2000.* Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes & Development*, 14(11), 1343–52.
- Kreke, M. R., Sharp, L. A., Woo Lee, Y., Goldstein, A. S. 2008.* Effect of Intermittent Shear Stress on Mechanotransductive Signaling and Osteoblastic Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells. *Tissue Engineering Part A*, 14(4), 529–537.
- Kuwana, M., Okazaki, Y., Kodama, H., Izumi, K., Yasuoka, H., Ogawa, Y., ... Ikeda, Y. 2003.* Human circulating CD14⁺ monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation. *Journal of Leukocyte Biology*, 74(5), 833–45.
- Ladich, E., Nakano, M., Carter-Monroe, N., Virmani, R. 2011.* Pathology of calcific aortic stenosis. *Future Cardiology*, 7(5), 629–42.
- Laforest, B., Nemer, M. 2012.* Genetic insights into bicuspid aortic valve formation. *Cardiology Research and Practice*, 1(1).
- LeMaire, S. A., McDonald, M.-L. N., Guo, D.-C., Russell, L., Miller, C. C., Johnson, R. J., ... Milewicz, D. M. 2011.* Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for thoracic aortic aneurysms and aortic dissections spanning FBN1 at 15q21.1. *Nature Genetics*, 43(10), 996–1000.
- Leopold, J. A. 2012.* Cellular mechanisms of aortic valve calcification. *Circulation. Cardiovascular Interventions*, 5(4), 605–14.
- Lilly, B., Kennard, S. 2009.* Differential gene expression in a coculture model of angiogenesis reveals modulation of select pathways and a role for Notch signaling. *Physiological*

Genomics, 36(2), 69–78.

- Loffredo, C. A. 2000.* Epidemiology of cardiovascular malformations: prevalence and risk factors. *American Journal of Medical Genetics*, 97(4), 319–25.
- Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N. G., Israël, A. 1998.* The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(14), 8108–12.
- Long, F., Chung, U., Ohba, S., McMahon, J., Kronenberg, H. M., McMahon, A. P. 2004.* Ihh signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton. *Development (Cambridge, England)*, 131(6), 1309–18.
- Luxán, G., D’Amato, G., MacGrogan, D., de la Pompa, J. L. 2016.* Endocardial Notch Signaling in Cardiac Development and Disease. *Circulation Research*, 118(1), e1–e18.
- Maitra, M., Koenig, S. N., Srivastava, D., Garg, V. 2010.* Identification of GATA6 sequence variants in patients with congenital heart defects. *Pediatric Research*, 68(4), 281–5.
- Makki, N., Capecchi, M. R. 2012.* Cardiovascular defects in a mouse model of HOXA1 syndrome. *Human Molecular Genetics*, 21(1), 26–31.
- Malashicheva, A., Kanzler, B., Tolkunova, E., Trono, D., Tomilin, A. 2007.* Lentivirus as a tool for lineage-specific gene manipulations. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 45(7), 456–9.
- Markwald, R. R., Fitzharris, T. P., Manasek, F. J. 1977.* Structural development of endocardial cushions. *American Journal of Anatomy*, 148(1), 85–119.
- Masri, A., Svensson, L. G., Griffin, B. P., Desai, M. Y. 2017.* Contemporary natural history of bicuspid aortic valve disease: A systematic review. *Heart*, 103(17), 1323–1330.
- Massy, Z. A., Mentaverri, R., Mozar, A., Brazier, M., Kamel, S. 2008.* The pathophysiology of vascular calcification: are osteoclast-like cells the missing link? *Diabetes & Metabolism*, 34, 16–20.
- Matsumoto, T., Kuriwaka-Kido, R., Kondo, T., Endo, I., Kido, S. 2012.* Regulation of osteoblast differentiation by interleukin-11 via AP-1 and Smad signaling. *Endocrine Journal*, 59(2), 91–101.
- Meloty-Kapella, L., Shergill, B., Kuon, J., Botvinick, E., Weinmaster, G. 2012.* Notch ligand endocytosis generates mechanical pulling force dependent on dynamin, epsins, and actin.

Developmental Cell, 22(6), 1299–312.

- Mikhaylova, L., Malmquist, J., Nurminskaya, M. 2007.* Regulation of in vitro vascular calcification by BMP4, VEGF and Wnt3a. *Calcified Tissue International*, 81(5), 372–81.
- Miller, J. D., Chu, Y., Brooks, R. M., Richenbacher, W. E., Peña-Silva, R., Heistad, D. D. 2008.* Dysregulation of antioxidant mechanisms contributes to increased oxidative stress in calcific aortic valvular stenosis in humans. *Journal of the American College of Cardiology*, 52(10), 843–50.
- Misfeld, M., Sievers, H.-H. 2007.* Heart valve macro- and microstructure. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 362(1484), 1421–36.
- Mohler, E. R. 2004.* Mechanisms of aortic valve calcification. *The American Journal of Cardiology*, 94(11), 1396–1402.
- Mohler, E. R., Gannon, F., Reynolds, C., Zimmerman, R., Keane, M. G., Kaplan, F. S. 2001.* Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation*, 103(11), 1522–8.
- Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Saxena, M. T., Griesemer, A., Tian, X., Pan, D. J., ... Kopan, R. 2000.* A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Molecular Cell*, 5(2), 197–206.
- Ng, C. M., Cheng, A., Myers, L. A., Martinez-Murillo, F., Jie, C., Bedja, D., ... Dietz, H. C. 2004.* TGF- β -dependent pathogenesis of mitral valve prolapse in a mouse model of Marfan syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 114(11), 1586–1592.
- Nigam, V., Srivastava, D. 2009.* Notch1 represses osteogenic pathways in aortic valve cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 47(6), 828–34.
- O'Brien, K. D. 2007.* Epidemiology and genetics of calcific aortic valve disease. *Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research*, 55(6), 284–91.
- Osman, L., Yacoub, M. H., Latif, N., Amrani, M., Chester, A. H. 2006.* Role of human valve interstitial cells in valve calcification and their response to atorvastatin. *Circulation*, 114(1 Suppl), I547-52.
- Otto, C. M., Kuusisto, J., Reichenbach, D. D., Gown, A. M., O'Brien, K. D. 1994.* Characterization

- of the early lesion of “degenerative” valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation*, 90(2), 844–53.
- Otto, C. M., Lind, B. K., Kitzman, D. W., Gersh, B. J., Siscovick, D. S. 1999.* Association of aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly. *The New England Journal of Medicine*, 341(3), 142–7.
- Parks, A. L., Klueg, K. M., Stout, J. R., Muskavitch, M. A. 2000.* Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development (Cambridge, England)*, 127(7), 1373–85.
- Peacock, J. D., Levay, A. K., Gillaspie, D. B., Tao, G., Lincoln, J. 2010.* Reduced Sox9 Function Promotes Heart Valve Calcification Phenotypes In Vivo. *Circulation Research*, 106(4), 712–719.
- Pepe, G., Nistri, S., Giusti, B., Sticchi, E., Attanasio, M., Porciani, C., ... Gensini, G. F. 2014.* Identification of fibrillin 1 gene mutations in patients with bicuspid aortic valve (BAV) without Marfan syndrome. *BMC Medical Genetics*, 15(1), 23.
- Pereira, L., Andrikopoulos, K., Tian, J., Lee, S. Y., Keene, D. R., Ono, R., ... Ramirez, F. 1997.* Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome. *Nature Genetics*, 17(2), 218–22.
- Pereira, L., Lee, S. Y., Gayraud, B., Andrikopoulos, K., Shapiro, S. D., Bunton, T., ... Ramirez, F. 1999.* Pathogenetic sequence for aneurysm revealed in mice underexpressing fibrillin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(7), 3819–23.
- Person, A. D., Klewer, S. E., Runyan, R. B. 2005.* Cell Biology of Cardiac Cushion Development. In *International review of cytology* (Vol. 243, pp. 287–335).
- Piera-Velazquez, S., Li, Z., Jimenez, S. A. 2011.* Role of Endothelial-Mesenchymal Transition (EndoMT) in the Pathogenesis of Fibrotic Disorders. *The American Journal of Pathology*, 179(3), 1074–1080.
- Pomerance, A. 1967.* Ageing changes in human heart valves. *British Heart Journal*, 29(2), 222–31.
- Proudfoot, D., Skepper, J. N., Shanahan, C. M., Weissberg, P. L. 1998.* Calcification of Human Vascular Cells In Vitro Is Correlated With High Levels of Matrix Gla Protein and Low Levels

of Osteopontin Expression.

- Qiao, J.-H., Mertens, R. B., Fishbein, M. C., Geller, S. A. 2003.* Cartilaginous metaplasia in calcified diabetic peripheral vascular disease: morphologic evidence of enchondral ossification. *Human Pathology*, 34(4), 402–7.
- Rajamannan, N. M. 2010.* Mechanisms of aortic valve calcification: the LDL-density-radius theory: a translation from cell signaling to physiology. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 298(1), H5-15.
- Rajamannan, N. M., Subramaniam, M., Rickard, D., Stock, S. R., Donovan, J., Springett, M., ... Spelsberg, T. 2003.* Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation*, 107(17), 2181–4.
- Rangarajan, A., Talora, C., Okuyama, R., Nicolas, M., Mammucari, C., Oh, H., ... Dotto, G. P. 2001.* Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *The EMBO Journal*, 20(13), 3427–36.
- Regalado, E. S., Guo, D., Prakash, S., Benseid, T. A., Flynn, K., Estrera, A., ... Milewicz, D. M. 2015.* Aortic Disease Presentation and Outcome Associated With ACTA2 Mutations Clinical Perspective. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 8(3), 457–464.
- Robinson, P. N., Booms, P., Katzke, S., Ladewig, M., Neumann, L., Palz, M., ... Rosenberg, T. 2002.* Mutations of FBN1 and genotype-phenotype correlations in Marfan syndrome and related fibrillinopathies. *Human Mutation*, 20(3), 153–161.
- Sahlgren, C., Gustafsson, M. V, Jin, S., Poellinger, L., Lendahl, U. 2008.* Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(17), 6392–7.
- Schipani, E., Maes, C., Carmeliet, G., Semenza, G. L. 2009.* Regulation of Osteogenesis-Angiogenesis Coupling by HIFs and VEGF. *Journal of Bone and Mineral Research*, 24(8).
- Schoen, F. J. 2012).* Mechanisms of function and disease of natural and replacement heart valves. *Annual Review of Pathology*, 7(1), 161–83.
- Schroeter, E. H., Kisslinger, J. A., Kopan, R. 1998.* Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature*, 393(6683), 382–6.
- Seya, K., Yu, Z., Kanemaru, K., Daitoku, K., Akemoto, Y., Shibuya, H., ... Furukawa, K.-I. 2011.*

- Contribution of bone morphogenetic protein-2 to aortic valve calcification in aged rat. *Journal of Pharmacological Sciences*, 115(1), 8–14.
- Shao, J.-S., Cai, J., Towler, D. A. 2006. Molecular mechanisms of vascular calcification: lessons learned from the aorta. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(7), 1423–30.
- Soor, G. S., Vukin, I., Leong, S. W., Oreopoulos, G., Butany, J. 2008. Peripheral vascular disease: who gets it and why? A histomorphological analysis of 261 arterial segments from 58 cases. *Pathology*, 40(4), 385–391.
- Sorescu, G. P., Song, H., Tressel, S. L., Hwang, J., Dikalov, S., Smith, D. A., ... Jo, H. 2004. Bone morphogenic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress induces monocyte adhesion by stimulating reactive oxygen species production from a nox1-based NADPH oxidase. *Circulation Research*, 95(8), 773–9.
- Suzuki A, Takayama T, Suzuki N, Sato M, Fukuda T, I. K. 2009. Daily low-intensity pulsed ultrasound-mediated osteogenic differentiation in rat osteoblasts. - PubMed - NCBI.
- Syvaranta, S., Helske, S., Laine, M., Lappalainen, J., Kupari, M., Mayranpaa, M. I., ... Kovanen, P. T. 2010. Vascular Endothelial Growth Factor-Secreting Mast Cells and Myofibroblasts: A Novel Self-Perpetuating Angiogenic Pathway in Aortic Valve Stenosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(6), 1220–1227.
- Theodoris, C. V, Li, M., White, M. P., Liu, L., He, D., Pollard, K. S., ... Srivastava, D. 2015. Human disease modeling reveals integrated transcriptional and epigenetic mechanisms of NOTCH1 haploinsufficiency. *Cell*, 160(6), 1072–86.
- Timmerman, L. A., Grego-Bessa, J., Raya, A., Bertrán, E., Pérez-Pomares, J. M., Díez, J., ... de la Pompa, J. L. 2004. Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes & Development*, 18(1), 99–115.
- Tischfield, M. A., Bosley, T. M., Salih, M. A. M., Alorainy, I. A., Sener, E. C., Nester, M. J., ... Engle, E. C. 2005. Homozygous HOXA1 mutations disrupt human brainstem, inner ear, cardiovascular and cognitive development. *Nature Genetics*, 37(10), 1035–7.
- Vattikuti, R., Towler, D. A. 2004. Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 286(5).
- Verma, D., Katti, K. S., Katti, D. R. 2010. Osteoblast adhesion, proliferation and growth on polyelectrolyte complex-hydroxyapatite nanocomposites. *Philosophical Transactions. Series*

- A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences, 368(1917), 2083–97.
- Wallby, L., Janerot-Sjöberg, B., Steffensen, T., Broqvist, M. 2002. T lymphocyte infiltration in non-rheumatic aortic stenosis: a comparative descriptive study between tricuspid and bicuspid aortic valves. *Heart (British Cardiac Society)*, 88(4), 348–51.
- Ward, C. 2000. Clinical significance of the bicuspid aortic valve. *Heart (British Cardiac Society)*, 83(1), 81–5.
- Weng, A. P., Millholland, J. M., Yashiro-Ohtani, Y., Arcangeli, M. L., Lau, A., Wai, C., ... Aster, J. C. 2006. c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes & Development*, 20(15), 2096–109.
- Wu, B., Wang, Y., Xiao, F., Butcher, J. T., Yutzey, K. E., Zhou, B. 2017. Developmental Mechanisms of Aortic Valve Malformation and Disease. *Annual Review of Physiology*, 79(1), 21–41.
- Xiao, G., Jiang, D., Ge, C., Zhao, Z., Lai, Y., Boules, H., ... Franceschi, R. T. 2005. Cooperative interactions between activating transcription factor 4 and Runx2/Cbfa1 stimulate osteoblast-specific osteocalcin gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(35), 30689–96.
- Yang, B., Zhou, W., Jiao, J., Nielsen, J. B., Mathis, M. R., Heydarpour, M., ... Willer, C. J. 2017. Protein-altering and regulatory genetic variants near GATA4 implicated in bicuspid aortic valve. *Nature Communications*, 8, 15481.
- Yao, J., Guihard, P. J., Blazquez-Medela, A. M., Guo, Y., Moon, J. H., Jumabay, M., ... Yao, Y. 2015. Serine Protease Activation Essential for Endothelial–Mesenchymal Transition in Vascular Calcification Novelty and Significance. *Circulation Research*, 117(9), 758–769.
- Yao, Y., Bennett, B. J., Wang, X., Rosenfeld, M. E., Giachelli, C., Lusis, A. J., Bostrom, K. I. 2010. Inhibition of Bone Morphogenetic Proteins Protects Against Atherosclerosis and Vascular Calcification. *Circulation Research*, 107(4), 485–494.
- Yassine, N. M., Shahram, J. T., Body, S. C. 2017. Pathogenic mechanisms of bicuspid aortic valve aortopathy. *Frontiers in Physiology*, 8(SEP), 1–16.
- Yetkin, E., Waltenberger, J. 2009. Molecular and cellular mechanisms of aortic stenosis. *International Journal of Cardiology*, 135(1), 4–13.

- Zanotti, S., Canalis, E. 2010.* Notch and the skeleton. *Molecular and Cellular Biology*, 30(4), 886–896.
- Zeng, Q., Song, R., Ao, L., Weyant, M. J., Lee, J., Xu, D., ... Meng, X. 2013.* Notch1 promotes the pro-osteogenic response of human aortic valve interstitial cells via modulation of ERK1/2 and nuclear factor- κ B activation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(7), 1580–90.
- Zimmet, P., Alberti, K. G., Shaw, J. 2001.* Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414(6865), 782–7.